

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



542937

(43) Fecha de publicación internacional  
12 de Agosto de 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/067740 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 15/09,  
C12Q 1/68

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2004/070001

(22) Fecha de presentación internacional:  
21 de Enero de 2004 (21.01.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200300206 28 de Enero de 2003 (28.01.2003) ES  
P200302671  
17 de Noviembre de 2003 (17.11.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo  
US): EFARMES, S.A. [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025  
Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MATA  
LOPEZ, Pedro [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025  
Barcelona (ES). ALONSO KARLEZI, Rodrigo, Al-  
berto [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).  
MOZAS ALONSO, Pilar [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025  
Barcelona (ES). REYES LEAL, Gilberto [ES/ES]; Sar-  
denya, 350, 08025 Barcelona (ES). POCIVI MIERAS,  
Miguel [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).  
CASTILLO FERNANDEZ, Sergio [ES/ES]; Sardenya,  
350, 08025 Barcelona (ES). TEJEDOR HERNANDEZ,

Diego [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).  
MARTINEZ MARTINEZ, Antonio [ES/ES]; Sardenya,  
350, 08025 Barcelona (ES). MALLÉN PEREZ, Miguel  
[ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto, de; Miguel Angel,  
21, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible): AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO  
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-  
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-  
ciones

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE DETECTION OF MUTATIONS IN ISOLATED GENE SEQUENCES OF  
THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDL-R) WHICH IS ASSOCIATED WITH FAMILIAL HYPERCHOLE-  
STEROLEMIA

(54) Título: PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLA-  
DAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLE-  
MIA FAMILIAR

(57) Abstract: The invention relates to extracorporeal methods of analysing the presence or absence of mutations which cause  
familial hypercholesterolemia. The inventive methods describe the way in which said mutations can be detected using a DNA sample  
from an individual and comprising the following: chain reaction of the polymerase with primers which are complementary to the low-  
density lipoprotein receptor gene; analysis of the amplified product by sequencing; restriction analysis; single strand conformation  
polymorphism techniques; heteroduplex analysis and analysis of a device on top of a biochip glass support on which oligonucleotide  
probes are disposed, which can be used to detect the aforementioned mutations in the DNA.

(57) Resumen: La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de mutaciones causantes de  
hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un  
individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas  
de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de  
conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se  
depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas mutaciones en el ADN.

WO 2004/067740 A1



---

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

- 1 -

**PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN  
SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS  
DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA  
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

5

**Ambito de la invención**

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico in vitro, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante técnicas de ingeniería genética, para determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de la enfermedad denominada  
10 hipercolesterolemia familiar.

**Antecedentes de la invención**

La aterosclerosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una combinación de cambios que se produce en la íntima de las arterias a consecuencia de un acúmulo focal de lípidos y componentes complejos que se acompaña  
15 con la formación de tejido fibroso y calcificación que a su vez se asocia con cambios en estructura de la media.

La aterosclerosis puede considerarse como una forma especial de arteriosclerosis con un depósito patogénico de lípidos en la pared arterial. La mayoría de formas de la arteriosclerosis implican la degeneración grasa de la pared vascular, con lo que el término  
20 arteriosclerosis y aterosclerosis suele utilizarse de forma indistinta (Assmann G. in "Lipid Metabolism and Atherosclerosis" Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart 1982:1).

Los lípidos son sustancias insolubles en disoluciones acuosas. Las lipoproteínas son las partículas que posibilitan el transporte de los lípidos en la sangre. Las lipoproteínas se dividen en varias categorías según su densidad dependiendo de como  
25 pueden separarse por ultracentrifugación. (Havel RJ y col. J Clin Invest 1955, 34:1345). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ( $d=1.019-1.063$  g/mL) son las que mayoritariamente transportan el colesterol en el torrente circulatorio. Estas lipoproteínas están formadas por el 75% de lípidos (principalmente colesterol libre, colesterol  
30 esterificado y fosfolípidos), alrededor el 70 % del colesterol total de la sangre es transportado por las partículas LDL.

- 2 -

El término hipercolesterolemia se utiliza para reflejar la elevación del colesterol del plasma por encima de los niveles considerados normales para una determinada población y es uno de los factores cruciales para el inicio y progresión de la arteriosclerosis. Más de la mitad de todas las muertes que se producen en los países desarrollados están relacionados con la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa (Murray CJL y Lopez AD. Lancet 1997; 349:1269-1276).

Las hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones que se producen en el gen del receptor de las LDL (r-LDL), este gen codifica una proteína que permite la captación y degradación intracelular de las LDL (Goldstein JL, y Brown MS Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39).

La penetrancia de la HF es cercana al 100% lo que significa que la mitad de la descendencia de una persona afectada tendrá su colesterol plasmático muy elevado desde el momento de nacer, afectando por igual a hombres y mujeres (Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. Editores: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw Hill New York 6<sup>th</sup> edition, 1989; 1215-1250).

Los pacientes con HF presentan como síntomas característicos clínicos arco corneal, xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). La HF es una de las enfermedades monogénicas mas frecuentes con una prevalencia estimada de pacientes heterocigotos de una en cada 500 personas y de heterocigotos de una en cada 1.000.000.

Determinadas poblaciones tales como los canadienses de habla francesa (Leitersdorf E y col. J Clin Invest 1990; 85:1014-1023), cristianos libaneses (Lehrman MA y col. J Biol Chem 1987; 262:401-410), drusos (Landsberger D y col. Am J Hum Genet 1992; 50: 427-433) finlandeses (Koivisto UM y col. J Clin Invest 1992; 90: 219-228), los "afrikaners" de Surafrica (Kotze MJ y col. Ann Hum Genet 1991; 55: 115-121), los judíos Ashkenazi de descendencia lituana (Meiner V y col. Am J Hum Genet 1991; 49:443-449) presentan la particularidad que solo tienen unas pocas mutaciones responsables de la HF, esto es consecuencia de un efecto fundador y por lo tanto la frecuencia de heterocigotos en estas poblaciones es mas alta que lo estimado para otras poblaciones.



- 3 -

Los pacientes con HF presentan una concentración de colesterol en plasma muy elevada, por regla general superior al percentil 95. La mortalidad de los pacientes con HF, ajustada por edad y sexo, es entre cuatro y cinco veces mas alta que en la población general (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). Los pacientes que heredan dos mutaciones en el locus del gen del r-LDL se denominan HF homocigotos o HF heterocigotos compuestos en cuyo caso prácticamente no hay receptores funcionales lo que condiciona que la concentración de c-LDL se eleve entre seis y ocho veces en relación a la considerada normal. La mayoría de pacientes de esta categoría presentan enfermedad coronaria antes de los 20 años (Goldstein JL y col. N Engl J Med 1983; 309:288-296). Si los pacientes homocigotos o los heterocigotos fueran diagnosticados antes de que presentaran signos de enfermedad coronaria y tratados de forma preventiva su riesgo de infarto de miocardio se vería reducido de forma sustancial

El r-LDL es una glicoproteína ubicua de membrana de 839 aminoácidos que capta e internaliza partículas LDL por un mecanismo denominado de endocitosis (Goldstein J. y Brown M. J Biol Chem 1974; 249:5153-5162) (Figura 1).

El gen del r-LDL se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 19 región p13.1-13.3 (Yamamoto T y col. Cell 1984; 39: 27-38), tiene un tamaño de 45.000 pares de bases (pb). Este gen consta de 18 exones y 17 intrones los cuales codifican los seis dominios funcionales de la proteína: El péptido señal, el dominio de unión del ligando, el dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la zona de glicosilación, el dominio transmembrana y el citoplásmico (Sundhof T y col. Science 1985; 228:893-895) (Figura 2).

La síntesis de r-LDL se encuentra regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen del r-LDL en función de las variaciones de la concentración intracelular de esteroides y la demanda celular de colesterol (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262:10773-10779). Las secuencias del ADN necesarias para la regulación de la transcripción del gen del r-LDL están situadas en una región de 177 pb de la zona promotora (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262: 10773-10779). Esta región contiene todos los elementos en cis que permiten la expresión basal así como la regulación por esteroides y contiene tres repeticiones de 16 pb cada una. La repetición 1 y 3 contienen un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y son

- 4 -

esenciales para que se produzca la expresión basal del gen pero requieren de la contribución de la repetición 2 para la expresión completa (Dawson PA y col. J Biol Chem 1988; 263:3372-3379). La repetición 2 incluye un elemento de regulación por esteroides de 10 pb, SRE-1 (Smith JR y col. J Biol Chem 1990; 265:2306-2310) que  
5 posibilita la unión del factor de transcripción denominado SREBP-1 el cual aumenta la transcripción cuando la concentración de esteroides intracelulares disminuye. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones situadas en los elementos reguladores de la transcripción del receptor LDL (Hobbs HH, y col al. Hum Mutat 1992; 1:445-466; Koivisto UM. Y col Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91:10526-10530), Mozas P, y col J  
10 Lipid Res 2002; 43:13-18, <http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

El exón 1 codifica el péptido señal el cual consiste en una secuencia de 21 amino ácidos que es eliminado de la proteína durante la translocación que tiene lugar en el retículo endoplásmico. Se han descrito varias mutaciones en este exón que incluyen cambios de pauta de lectura, cambios de aminoácido o codones de parada  
15 (<http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

Los exones del 2 al 6 codifican el dominio de unión al ligando, el cual consta de siete repeticiones en tandem de 40 amino ácidos. La estructura de este dominio ha sido resuelta de forma parcial (Jeon H y col. Nature Struc Biol 2001; 8:499-5049). En cada repetición tiene una agrupación de aminoácidos cargados negativamente Asp-X-Ser-Asp-  
20 Glu y seis restos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro.

El segundo dominio del r-LDL consta de una secuencia de 400 amino ácidos codificada por los exones 7 al 14. Esta secuencia tiene un 33% de homología con el factor precursor del crecimiento de la epidermis (EGFP). Al igual que el dominio de unión al ligando, esta región, contiene tres repeticiones de 40 amino ácidos con  
25 secuencias ricas en cisteína. Las dos primeras repeticiones, denominadas A y B, son contiguas y están separadas de la tercera repetición por una región de 280 amino ácidos que contiene cinco copias de la secuencia YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). El dominio análogo al EGFP es fundamental para la disociación ácida del r-LDL de las partículas recubiertas de clatrina que tiene lugar en el endosoma durante el proceso de reciclado del  
30 receptor. De todas las mutaciones descritas hasta la fecha, aproximadamente el 55% están localizadas en la región homóloga EGFP y el 35% están localizadas en las repeticiones YWTD (<http://www.ucl.ac.uk/fh>).

- 5 -

El tercer dominio del r-LDL, codificado por el exón 15, es una región en la que abundan los amino ácidos treonina y serina. La función de este dominio se desconoce, pero se sabe que en esta región están ancladas las cadenas de carbohidratos. Esta zona está muy poco conservada en seis especies analizadas y se cree que desempeña una función estabilizadora del receptor. (Goldstein y col. En *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Editores Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7<sup>th</sup> Edition. McGraw Hill, 1995: 1981-2030).

El dominio transmembrana consta de 22 amino ácidos hidrofóbicos codificados por el exón 16 y el extremo 5' del exón 17. Este dominio es esencial para el anclaje del receptor a la membrana celular.

El dominio citoplásmico del r-LDL, está formado por una secuencia de 50 amino ácidos codificada por la región 3' del exón 17 y la 5' del exón 18. Este dominio contiene dos secuencias señal que permiten dirigir a la proteína a la superficie celular y situar al receptor en las partículas revestidas (Yokode M, y col. *J Cell Biol* 1992; 117: 39-46). Este dominio es uno de los más conservados, con un porcentaje de aminoácidos conservados del 86% entre seis especies analizadas.

Las mutaciones del r-LDL que se han encontrado en pacientes con HF se clasifican en 5 clases: alelos nulos, defectuosos en el transporte, defectuosos en la unión, en la internalización y reciclado. Por regla general cada categoría está asociada con mutaciones localizadas en una región del gen que codifican un dominio particular de la proteína. (Hobbs HH, et al. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466).

La heterogeneidad que presentan los pacientes con HF en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol ligado a LDL (C-LDL) y enfermedad coronaria se debe en parte a diferencias en cuanto al tipo de mutación (Sun XM y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1680-1688, Kotze y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13: 1460-1468; Gudnason V y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17:3092-3101). Por otra parte, el descenso que se produce en la concentración del c-LDL en pacientes HF heterocigotos tras el tratamiento con inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa depende, en parte, de la naturaleza de la mutación del gen r-LDL (Leisterdorf E y col. *Circulation* 1993; 87:35-44; Jeenah M y col. *Atherosclerosis* 1993; 98:51-58, Sijbrands EJG y col. *Atherosclerosis* 1998; 136: 247-254).

- 6 -

El principal ligando del receptor es la partícula LDL la cual contiene una sola copia de una proteína denominada la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) (Goldstein J y Brown M J Biol Chem 1974; 249:5153-5162). Esta apolipoproteína tiene una zona en la que abundan los aminoácidos básicos y es el lugar donde se une al receptor (Borén J y col. J Clin Invest 1998; 101: 1084-1093). Se han encontrado varias mutaciones en el gen de la apoB-100 que alteran la funcionalidad de la proteína y disminuyen la capacidad de retirada de las partículas LDL, dando como resultado el acúmulo de c-LDL en plasma. Hasta la fecha se han descrito cuatro mutaciones en el gen de apo B-100 que cursan con una hipercolesterolemia que se denomina apolipoproteína B defectuosa familiar (BDF), todas estas mutaciones se encuentran localizadas en el dominio de unión de la apo-B100; amino ácidos 3130-3630: R3480W, R3500Q, R3500W y R3531C (Soria L y col. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 587-591; Pullinger CR, y col. J Clin Invest 1995; 95:1225-1234; Gaffney D, y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1025-1029; Boren J, y col. J Biol Chem 2001; 276: 9214-9218). Una mutación que cambia el codón de la posición 3500 CGG por CAG dando lugar a una sustitución de una Glutamina por Arginina (R3500Q), es la mas frecuente de toda las que cursan con BDF. Los pacientes heterocigotos para la mutación apo B-3500 son por regla general hipercolesterolemicos, aunque su concentración de colesterol total plasmático varía dentro del rango observado en pacientes con HF hasta concentraciones moderadamente elevadas. (Tybjaerg-Hansen A, y col. Atherosclerosis 1990; 80:235-242; Hansen PS, y col. Arterioscl Throm Vasc Biol 1997; 17:741-747). Dado que las características y bioquímicas de estos pacientes son muy similares, el diagnóstico diferencial entre los pacientes con BDF o HF sólo es posible a través del diagnóstico genético molecular.

El diagnóstico clínico de la HF se fundamenta en los datos analíticos de lípidos y lipoproteínas del plasma, sintomatología clínica (xantomas) e historia familiar y personal de enfermedad coronaria. La OMS a través de su programa MedPed recomienda una serie de criterios a seguir para llevar a cabo el diagnóstico clínico de HF. Estos criterios están basados en una puntuación que depende de la historia personal y familiar de hipercolesterolemia, de las características clínicas y de la analítica del paciente. Cuando la puntuación que alcanza el paciente es igual o superior a 8 puntos el criterio clínico de diagnóstico de HF se clasifica como "seguro", entre 5 y 8 puntos de "probable" y entre 3 y 5 puntos de "posible" (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO

- 7 -

consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). Sin embargo, algunos pacientes no cumplen con los criterios de HF porque la historia familiar es incompleta o desconocida, o bien porque en el momento del análisis solo presentan concentraciones moderadas de colesterol plasmático y carecen de signos de depósito de  
5 colesterol en tejidos, tales como xantomas tendinosos, arco corneal o xantelasmas.

En familias cuyo mutación del gen del r-LDL se conoce se ha demostrado que el mejor “punto de corte” para el diagnóstico es el utilizar el percentil 90 para la concentración de c-LDL (Umans-Eckenhause MAW y col. Lancet 2001; 357:165-168. Sin embargo, el 18% de los pacientes portadores de la mutación presentan una  
10 concentración de colesterol total por debajo de este percentil, por otra parte, la proporción de falsos positivos fue también del 18%. Por lo tanto, se comete porcentaje alto de diagnósticos equivocados si se utiliza solo la cifra de colesterol plasmático. Se ha publicado, que más del 50% de los pacientes con HF no reciben tratamiento farmacológico hipolipemiante ni consejo dietético como consecuencia de no haber sido  
15 diagnosticados correctamente como pacientes con HF (Williams RR y col. Am J Cardiol 1993; 72:18D-24D).

El conocimiento de las bases moleculares de la HF ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico inequívoco a nivel del ADN en la gran mayoría de casos: la demostración de un defecto molecular en el gen del r-LDL constituye una confirmación  
20 definitiva del diagnóstico (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). El diagnóstico preciso de la HF es posible utilizando métodos de biología molecular, sin embargo, en la actualidad su utilidad en poblaciones heretogéneas se encuentra limitada debido a la gran heterogeneidad de las mutaciones del gen del r-LDL.

En la solicitud PCT WO-88/03175 (Biotechnology Research Partners, Ltd.) se reivindica un método para el diagnóstico de la aterosclerosis, que se basa en la detección de la presencia o ausencia de varios polimorfismos en la región génica de la apolipoproteína AI-CIII-AIV, o en los genes apoB, apoCI, apoAII, así como en el gen del receptor de LDL. Concretamente para este gen, se presenta el empleo de los  
25 polimorfismos Cfr131 y BstEII.  
30

Otro documento de interés es la patente japonesa JP-10099099 que, se refiere al empleo de una mutación en el triplete codificante del aminoácido 109, en concreto la

- 8 -

inserción de una C, para el diagnóstico de anormalidades en el gen del receptor de LDL, aunque no se menciona concretamente la hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, las patentes norteamericana US-4.745.060 y US-4.966.837, ambas de la Universidad de Texas, presentan métodos para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar basándose en mutaciones en el gen del receptor de LDL. Sin embargo, lo que se reivindica en la primera de ellas son secuencias correspondientes al gen "normal", presentando un ejemplo puntual de una mutación que se define por el cambio del mapa de restricción con Xba I. En la segunda patente, por su parte, se reivindica el empleo de varias enzimas de restricción (Eco RI, Asp 718, Taq I, Bam HI, Xba I, Inf. I, Bgl II, Cla I, Eco RV, Kpn I, Pvu II, Sph I, Sst I, Sst II, Stu I, Xho I, Nde I y Nsi I) en un método para determinar mutaciones en el gen r-LDL, que se basa en observar la alteración del modelo de restricción con estas enzimas frente al modelo correspondiente al gen normal.

El documento de patente más próximo a la invención es WO02/06467, en el que se describe un método de detección de errores en el metabolismo lipídico basado en una serie de mutaciones y polimorfismos del gen r-LDL. Sin embargo, ninguna de las mutaciones ni polimorfismos descritos en dicha patente coincide con los reivindicados en la presente solicitud.

### Descripción detallada de la invención

- La nomenclatura de las mutaciones y los polimorfismos viene definida en
- Antorakis S. E and the Nomenclature Working Group, Recommendations for Nomenclature Systems for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3; 1998.
  - Dunnen JT, Antorakis S.E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to describe Complex Mutations: A Discussion. Human Mutation 15: 7-12, 2000.
- Asimismo el concepto del polimorfismos se define en
- Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics 3rd Edition. Amsterdam. North-Holland 1980.
  - Beauder AL, Scriver CL, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, En The Metabolic and Molecular Bases of

- 9 -

Inherited Disease. Editores Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D 7<sup>th</sup> Edition. pg. 53 MacGraw Hill. New York 1995.

Se han detectado, aislado y caracterizado toda una serie de mutaciones nuevas que se detallan a continuación. Asimismo, toda una serie de mutaciones y polimorfismos ya descritos, se han combinado con aquéllas para analizar la probabilidad de que un individuo desarrolle hipercolesterolemia familiar. Todas las mutaciones y polimorfismos que en esta invención se relacionan con el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, se producen en la secuencia génica SEQ ID NO: 1 correspondiente al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL). Es decir, todas las mutaciones se producen en el mismo gen, se emplean en el mismo dispositivo de ensayo, utilizándose la misma tecnología, para determinar, según un mismo método, extracorpóreamente e in vitro, la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad, lo que apoya el carácter unitario de la invención.

En la Tabla I se detallan todas las mutaciones nuevas detectadas, según la nomenclatura científicamente aprobada y detallada en las publicaciones mencionadas anteriormente. Asimismo se les otorga un código alfa-numérico.

En la Tabla II se detallan mutaciones ya descritas y conocidas, cuyo uso en combinación con las mutaciones de la Tabla I, en dispositivos de ensayo in vitro para diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar es una de las formas preferidas, nueva e inventiva, de realización de la invención. Asimismo, de forma análoga a lo mencionado para las mutaciones conocidas, en la Tabla III se detallan polimorfismos.

Las mutaciones de amino ácidos se representan en códigos de una letra que tienen su equivalencia según la Tabla IV.

- 10 -

TABLA I

	MUTACION	CÓDIGO
5	(-23)A>C	M002
	1054 del11	M006
	108delC	M008
	1197del9	M009
10	1207delT	M010
	1432delG	M012
	191-2delAinsCT	M016
	2184delG	M020
	231delC	M022
15	2399del5/ins4	M024
	313+1insT	M027
	338del16	M029
	509insC	M030
	675del15	M032
20	684dup12	M034
	941-39C>T	M041
	C195R	M046
	C255G	M0100
	C319Y	M050
25	D157G	M059
	D630N	M063
	E291X	M068
	H635N	M096
	N59K	M074
30	T41M	M097
	W515X	M098
	Y379X	M092
	Y421X	M093
	T433N	M105
35	818del8	M110
	1423delGC/insA	M111
	1204insT	M112
	451del3	M115
	G516X	M117
40	2389+4A>G	M120
	1815del11	M121
	1186+5G>A	M129
	T740M	M131
	I771T	M135
45	R279G	M138
	T446I	M141
	H562Q	M142



- 11 -

	C74Y	M145
	D686Y	M147
	G(-2)R	M149
	E579D	M150
5	S205C	M151
	D200V	M153
	V766E	M154
	L(-6)P	M155
	2544insC	M156
10	C42Y	M157
	2389+3A>C	M160
	[1587-5del5;1587del31]M161	

TABLA II

15	<b>MUTACIÓN</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>MUTACIÓN</b>	<b>CODIGO</b>
	2393del9	M001	C646Y	M053
	(-42)C>G	M003	C677Y	M054
	(-49)C>T	M004	C68W	M055
20	1045delC	M005	C74G	M056
	1061-8T>C	M007	C95R	M057
	A378T	M0102	D151N	M058
	C358R	M0104	D200G	M060
	1358+1G>A	M011	D200Y	M061
25	1706-10G>A	M014	D280G	M062
	1845+1G>C	M015	E10X	M064
	2085del19	M017	E246A	M066
	211delG	M018	E256K	M067
	2140+5G>A	M019	F634L	M069
30	2207insT	M021	G322S	M070
	2390-1G>C	M023	G352D	M071
	313+1G>C	M025	G571E	M072
	313+1G>A	M026	N543H	M073
	518delG	M031	N804K	M075
35	7delC	M035	Q12X	M076
	872delC	M036	Q133X	M077
	884delT	M038	Q357P	M078
	920ins4	M039	Q427X	M079
	A519T	M042	Q71E	M080
40	C113W	M043	R395Q	M081
	C127R	M045	R574W	M082
	C255X	M047	R612C	M083
	C281Y	M048	S156L	M084
	C297F	M049	S205P	M085
45	C347Y	M051	T413K	M086
	C371X	M052	T705I	M087

- 12 -

TABLA II (continuación)

	MUTACIÓN	CODIGO
5	V502M	M089
	W(-18)X	M090
	W541X	M091
	D679E	M094
	1359-1G>A	M099
10	681ins21	M033
	C122X	M044
	V408M	M088
	G528D	M106
	D412H	M107
15	N619N	M108
	E80K	M109
	L534P	M113
	L621S	M114
	C356Y	M116
20	R329X	M119
	G248D	M122
	C201Y	M125
	313+5G>A	M126
	C358Y	M127
25	C331R	M128
	D157N	M130
	V776M	M134
	P664L	M136
	W462X	M137
30	Q328X	M139
	L584P	M140
	R395W	M143
	G314V	M144
	W469X	M146
35	P678L	M148
	R612H	M152
	R236W	M159

- 13 -

TABLA III

	POLIMORFISMOS	CÓDIGO
5	81T>C BstUI Exón 2	P1
	1060+10G>C SmaI Exón 7	P2
	1171G>A StuI Exón 8	P3
	1413G>A DdeI Exón 10	P4
10	1617C>T BstNI Exón 11	P5
	1725C>T SSCP Exón 12	P6
	1771C>T HincII Exón 12	P7
	1959 T>C AvaII Exón 13	P8
15	2232G>A MspI Exón 15	P9

TABLA IV

	<u>CÓDIGOS AMINOÁCIDOS</u>		
20	Alanina	Ala	A
	Aspártico	Asp	D
	Glutámico	Glu	E
	Glicina	Gly	G
25	Fenilalanina	Phe	F
	Leucina	Leu	L
	Serina	Ser	S
	Tirosina	Tyr	Y
	Cisteina	Cys	C
30	Triptófano	Trp	W
	Leucina	Leu	L
	Prolina	Pro	P
	Histidina	His	H
	Glutamina	Gln	Q
35	Arginina	Arg	R
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
	Treonina	Thr	T
	Asparagina	Asn	N
40	Lisina	Lys	K
	Serina	Ser	S
	Arginina	Arg	R
	Valina	Val	V
45	Terminación	Ter	X

- 14 -

El dispositivo de ensayo (biochip) desarrollado en la invención consta de un soporte que presenta en su superficie toda una serie de sondas que se recogen en el listado de secuencias. Estas sondas oligonucleotídicas son capaces de hibridar con las secuencias mutadas contenidas en las Tablas I a III. La sistemática a utilizar sería la siguiente, para  
5 cada una de las mutaciones.

#### **Impresión de los portas de vidrio**

- Se imprimen los oligonucleótidos capaces de detectar la mutación en un porta de vidrio aminosilanado empleando DMSO como tampón de impresión.
- 10 • La impresión se lleva a cabo con un "spotter" o impresor de oligonucleótidos en el que se controlan la temperatura y la humedad.

#### **Procesamiento de los portaobjetos de vidrio**

- Tras la impresión se somete a un tratamiento con radiación ultravioleta.  
15

#### **Preparación de la muestra a hibridar**

- Se extrae el ADN del paciente a partir de una muestra de sangre de aproximadamente 300 µl mediante un protocolo de filtración.
- Se amplifican para dicho paciente todos los exones y el promotor del gen del receptor LDL, a través de PCR multiplex.  
20
- En la misma reacción de amplificación se incorpora un nucleótido unido a biotina constituyendo un marcaje indirecto que requiere un revelado final con un complejo fluoróforo-estreptavidina.
  - Se comprueba en gel de agarosa que ha tenido lugar reacción de amplificación.
  - 25 ◦ Se somete a fragmentación la muestra a hibridar.
  - Se añade el tampón de hibridación.
  - Se procede a la desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C.

#### **Hibridación**

- 30 • La hibridación se lleva a cabo automáticamente en la estación desarrollada para tal fin por Amersham Biosciences.
- Se prehibrida el portaobjetos.

- 15 -

- Se inyecta con una pipeta Hamilton la solución a hibridar.
- Se hibrida durante 1 hora.
- Se lava 3 veces con tampón de lavado.
- La estación procede al secado del soporte de vidrio.

5

#### **Escaneado del portaobjetos**

- Se introduce el portaobjetos en el escáner.
- Se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

10

#### **Cuantificación de la imagen**

- El software del escáner nos permite cuantificar en la imagen obtenida la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.
- A partir de la señal que se obtiene en los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado establecemos la presencia o ausencia de la mutación en el paciente.

15

Cada mutación presenta en el portaobjetos cuatro oligonucleótidos repetidos 10 veces para su detección. Dos de ellos detectan el alelo normal y otros dos el mutado. La base interrogada se encuentra siempre en posición central.

20

En el caso de un paciente normal (Fig. 3A), no presenta alelo mutado. Por consiguiente en la imagen que se obtiene del soporte de vidrio los oligonucleótidos que detectan dicho alelo no presentan señal de hibridación o una señal menor que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal.

25

Por el contrario, un individuo heterocigoto (Fig. 3B) para la mutación presenta el alelo normal y el mutado. De ahí que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado presentan una señal de hibridación equivalente.

30

Los resultados de la hibridación del ADN-chip con PCRs marcados, producidos a partir del ADN de los individuos a analizar, demuestran que el individuo representado en la Figura 3A no tiene una mutación puntual en el gen rLDL que ocasiona un cambio de aminoácido E256K, y que el individuo de la Figura 3B es heterocigoto para esa mutación. De esta forma el individuo heterocigoto quedaría diagnosticado genéticamente como hipercolesterolémico familiar.

A continuación se detallan mediante ejemplos el análisis de algunas de las

- 16 -

mutaciones detectadas con el dispositivo de ensayo de la invención.

**EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 1 del gen del r-LDL.**

5           Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 1 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex1F (SEQ ID NO: 2) y Ex1R (SEQ ID NO: 3).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
10   200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 74°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

15           Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de  
20   restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación (-23)A>C**

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Ava II. Cinco microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15  
25   unidades de Ava II en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 148 y 67 pb para el alelo normal y de 93, 55 y 67 para el alelo mutado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede  
30   analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39.

- 17 -

La mutación (-23)A>C se encontró en una mujer de 60 años que presentaba arco corneal y xantelasmas, habiendo sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 8 según los criterios de diagnóstico del MedPed (Familial hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). La historia familiar no reveló evidencia de enfermedad cardiovascular prematura en familiares de primer grado. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) 352 mg/dL, c-LDL 271 mg/dL, y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 251 y 171 mg/dL respectivamente.

#### **Análisis de la mutación L(-6)P**

Esta mutación (47T>C, CTC>CCC, Leu(-6)Pro) se caracterizó mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Se llevó a cabo su confirmación posterior por secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 y SEQ ID NO: 243.

La mutación L(-6)P se encontró en una mujer de 47 años con arco corneal, cuyo padre tenía hipercolesterolemia con un CT de 350 mg/dL y dos tíos paternos con hipercolesterolemia habían fallecido de infarto de miocardio a los 24 y 33 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una

- 18 -

puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL 320 mg/dL, TG 155mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (15mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 289 y 233 mg/dL respectivamente.

5

#### **Análisis de la mutación G(-2)R**

Esta mutación (58G>A, GGG>AGG, Gly(-2)Arg) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222 y SEQ ID NO: 223.

La mutación G(-2)R se encontró en una mujer de 34 años con arco corneal, cuya madre presentaba hipercolesterolemia con un CT de 400 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Sus concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT de 354 mg/dL, c-LDL de 264 mg/dL, con TG dentro de la normalidad y c-HDL de 64 mg/dL.

#### **EJEMPLO 2: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 2 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 183 pb del exón 2 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex2F (SEQ ID NO: 4) y Ex2R (SEQ ID NO: 5).



- 19 -

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

5 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### 15 Análisis de la mutación 108delC

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron

20 tenían un tamaño de 150 y 33 pb para el alelo normal y de 118, 33 y 32 para el alelo mutado; estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43.

25 La mutación 108delC se encontró en una mujer de 50 años sin ninguna sintomatología clínica, fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 9 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. La historia familiar mostró que un familiar en primer grado había tenido enfermedad cardiovascular prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico

30 fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 321 mg/dL, TG 142 mg/dL y c-HDL 32 mg/dL.

- 20 -

**Análisis de la mutación T41M**

Esta mutación (185C>T, ACG>ATG, Thr41Met) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Tai*I. Quince microlitros del material amplificado del exón 2 se hidrolizaron con 15 unidades de *Tai*I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 154 y 29 pb para el alelo normal y de 183 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 143.

La mutación T41M se detectó en un hombre de 69 años que había tenido un infarto de miocardio a la edad de 55 años, y que había sido diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar: 6 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. El paciente tenía historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 274 mg/dL, c-LDL 217 mg/dL y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad.

**Análisis de la mutación C42Y**

Esta mutación C42Y (188G>A, TGC>TAG, Cys42Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 183 pb correspondiente al exón 2 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex2F (SEQ ID NO:4) y Ex2R (SEQ ID NO:5) Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

- 21 -

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250 y SEQ ID NO: 251.

La mutación C42Y se encontró en un varón de 17 años que presentaba arco corneal, y cuya madre tenía una hipercolesterolemia grave. El diagnóstico clínico de  
5 hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 350 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL dentro de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20 mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 274 y 214 mg/dL respectivamente.

10

#### **Análisis de la mutación C74Y**

Esta mutación C74Y (284 G>A, TGC>TAC, Cys74Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 196 pb correspondiente al exón 3 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de  
15 hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO:7) Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático  
20 CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado G>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214 y SEQ ID NO: 215.

25 La mutación C74Y se encontró en un varón de 52 años que presentaba arco corneal y xantomas tendinosos con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia. Fue diagnosticado de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 17 puntos Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, TG 96 mg/dl y c-HDL 69 mg/dl. El  
30 tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa a dosis de 10 mg/día redujo su cifra de c-LDL en un 22%.

- 22 -

**EJEMPLO 3: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 3 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 196 pb del exón 3 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO: 7).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**20 Análisis de la mutación 191-2delAinsCT**

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BfaI en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

Se amplificó un fragmento de 184 pb del exón 3 por la técnica de PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3R (SEQ ID NO: 7) y Mut191-2F (SEQ ID NO: 8).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 23 -

durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 161 y 23 pb para el alelo normal y de 185 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47.

La mutación 191-2delAinsCT se encontró en dos familias aparentemente no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 58 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y angina de pecho y con historia familiar de enfermedad coronaria e hipercolesterolemia. Fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 559 mg/dL, c-LDL 467 mg/dL, TG 175 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 302 y 228 mg/dL respectivamente.

#### Análisis de la mutación N59K

Esta mutación (240C>A, AAC>AAA, Asn59Lys) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 111 y 85 pb para el alelo normal y de 196 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

- 24 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51.

La mutación se detectó en un hombre de 43 años diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 12 según criterios del MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio de tratamiento farmacológico fueron: CT 465 mg/dL, c-LDL 397 mg/dL, TG 100 mg/dL y c-HDL 48 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 350 y 282 mg/dL respectivamente. Su madre había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 58 años y el probando tenía un hijo de 8 años con hipercolesterolemia (CT 325 mg/dL y c-LDL 241 mg/d).

#### Análisis de la mutación 231delC

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HaeIII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 76, 51, 41 y 25 pb para el alelo normal y de 117, 51 y 27 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

La mutación se detectó en una mujer de 37 años que presentaba arco corneal y que había sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 16 puntos según criterios del programa de la OMS, MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 543 mg/dL, c-LDL 456 mg/dL, TG 178 mg/dL y c-HDL 51 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente combinado con atorvastatina (40 mg/día) y colestipol (20 g/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 260 y 190 mg/dL respectivamente. Un hermano había tenido infarto de miocardio a la edad de 38 años, y uno de sus hijos de 12 años era hipercolesterolémico con una concentración de CT de 305 mg/dL.

- 25 -

**Análisis de la mutación 313+1insT**

Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción TruI. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de TruI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de esta hidrólisis tenían un tamaño de 196 pb para el alelo normal y de 162 y 34 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59.

La mutación 313+1insT se detectó en una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y arco corneal. No se observó historia familiar de enfermedad coronaria prematura en sus familiares en primer grado. Según los criterios clínicos de hipercolesterolemia del MedPed esta mujer tenía una puntuación de 19. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 574 mg/dL, c-LDL 505 mg/dL y con TG y c-HDL estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente combinado con simvastatina (80 mg/día) y colestipol (20 g/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 286 y 225 mg/dL, respectivamente.

20

**EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4A del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 242 pb de la zona 5' del exón 4 (4A) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos: Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y Ex4AR (SEQ ID NO: 10).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

30

- 26 -

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia  
5 de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### **Análisis de la mutación 338del16**

Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción  
10 Van91I. Quince microlitros del material amplificado del exón 4A se hidrolizaron con 15 unidades de Van1I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 242 pb para el alelo normal y de 194 y 52 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al  
15 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 y SEQ ID NO: 147.

La mutación 338del16 se encontró en tres familias no relacionadas con  
20 hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un varón de 40 años con xantomas tendinosos y arco corneal, CT 542 mg/dL y c-LDL de 441 mg/dL, con TG y c-HDL normales. La puntuación para el diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar según el MedPed fue de 19 puntos. No se observó que hubiese historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El tratamiento  
25 hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 293 y 218 mg/dL, respectivamente.

#### **Análisis de la mutación 509insC**

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un  
30 desoxioligonucleótido con tres bases desapareadas, una de las cuales crea un sitio de reconocimiento par la enzima de restricción MnlI en presencia del alelo mutado pero no desaparece en presencia del alelo normal.



- 27 -

Se amplificó un fragmento de 244 pb del exón 4A por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y el desoxioligonucleótido Mut509insCR (SEQ ID NO: 11).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 141, 99 y 4 pb para el alelo normal y de 141, 88, 12 y 4 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63.

La mutación 509insC se encontró en una mujer de 44 años con hipercolesterolemia CT 477 mg/dL y c-LDL 394 mg/dL con TG y c-HDL normales, sin historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. El diagnóstico clínico según criterios del MedPed alcanzó una puntuación de 9. Dos de sus hermanos tenían hipercolesterolemia con una concentración de c-LDL por encima del percentil 95.

25

### Análisis de la mutación 451del3

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 4 (4A) del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4AF (SEQ ID NO:9) y

30

- 28 -

Ex4AR (SEQ ID NO:10). La posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección de tres nucleótidos se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174 y SEQ ID NO: 175.

La mutación 451del3 se encontró en un varón de 36 años que presentaba arco corneal y que había padecido un infarto de miocardio a los 34 años de edad. Este paciente tenía dos hijos de 2 y 8 años de edad con hipercolesterolemia grave con cifras de CT de 320 y 375 mg/dL respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar de este paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes de iniciar del tratamiento farmacológico hipolipemiente fueron: CT 449 mg/dL, c-LDL 367 mg/dL, TG 218 mg/dL y c-HDL 38 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

#### **EJEMPLO 5: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4B del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 237 pb de la zona 3' del exón 4 (4B) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex4BF (SEQ ID NO: 12) y Ex4BR (SEQ ID NO: 13).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia

- 29 -

de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### **Análisis de la mutación D157G**

5        Esta mutación (533A>G, GAT>GGT, Asp157Gly) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 237 pb correspondiente al material amplificado sin digerir para el alelo normal y de 175 y 62 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 15    67.

La mutación D157G se encontró en una mujer de 32 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 358 mg/dL y c-LDL 296 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL de 57 y 61 mg/dL, respectivamente. El tratamiento con atorvastatina (10 mg/día) redujo su colesterol total a 212 mg/dL y su c-LDL a 140 mg/dL. Su familia paterna presentaba historia de hipercolesterolemia: El padre con CT de 364 mg/dL, y la abuela y un tío paterno con CT de 341 mg/dL y 320 mg/dL, respectivamente.

25

#### **Análisis de la mutación C195R**

Esta mutación (646T>C, TGT>CGT, Cys195Arg) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 237 pb, correspondiente al material amplificado sin digerir, para el alelo normal y de 159 y 78 pb para el alelo mutado. Estos

30

- 30 -

fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71.

5 La mutación C195R se detectó en una mujer de 64 años con arco corneal, con hipercolesterolemia e historia familiar de enfermedad coronaria prematura en su madre. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar fue clasificado de seguro con una puntuación según criterios del MedPed de 11. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 560 mg/dL y c-LDL 468 mg/dL con niveles de  
10 TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

#### **Análisis de la mutación 675del15**

Esta mutación se puede identificar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 4B cuando  
15 existe mutación muestra la presencia de bandas de heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homoduplex de 237 y 222 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta  
20 mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75.

La mutación 675del15 se detectó en una mujer de 63 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su  
25 diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos siendo clasificado de seguro. No se pudo conseguir la colaboración sus familiares para realizar el estudio lipídico y genético. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y c-LDL 379 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

30

- 31 -

**Análisis de la mutación 684dup12**

Esta mutación se analizó por digestión del fragmento amplificado del exón 4B con la endonucleasa de restricción MnlI. La adición de 12 pb adicionales que produce la mutación permite detectar la presencia de la mutación en el material amplificado del exón 4B por electroforesis en poliacrilamida al 8% y tinción del gel con bromuro de etidio. Adicionalmente, quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 192 y 45 pb para el alelo normal y de 204 y 45 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79.

La mutación 684dup12 se detectó en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un hombre de 63 años con xantomas tendinosos y arco corneal, que había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 55 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 469 mg/dL y c-LDL 408 mg/dL, con niveles de TG de 100 mg/dL y c-HDL de 41 mg/dL.

**Análisis de la mutación D200V**

Esta mutación D200V (662A>T, GAC>GTC, Asp200Val) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador

- 32 -

automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado A>T se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 y SEQ ID NO: 235.

La mutación D200V se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 43 años con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia y cuya madre y hermano presentaban niveles de c-LDL por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina, 40 mg/dL) fueron: CT 329 mg/dL, TG 73 mg/dl y c-HDL de 41 mg/dl y unos niveles de c-LDL de 273 mg/dL.

#### 15 Análisis de la mutación S205C

La mutación S205C (677C>G, TCT>TGT, Ser205Cys) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos suministrados en el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230 y SEQ ID NO: 231.

La mutación S205C se encontró en una mujer de 39 años con historia familiar de hipercolesterolemia (madre y hermano con niveles de CT de 450 y 500 mg/dL respectivamente) y con 2 hijos con CT por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, realizado a los 20 años, alcanzó una puntuación según

- 33 -

criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 390 mg/dL, 150 mg/dL y c-HDL 35 mg/dL y unos niveles de c-LDL de 325 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

5

**EJEMPLO 6: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 6 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 179 pb del exón 6 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP): los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación C255G**

Como esta mutación (826T>G, TGC>GGC, Cys255Gly) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BstUI en presencia del alelo mutado, que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 163 pb del exón 6 por la técnica de la PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6R (SEQ ID NO: 15) y MutC255GF (SEQ ID NO: 16).

- 34 -

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

5 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BstUI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante

10 (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 163 pb para el alelo normal y de 141 y 22 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID

15 NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83.

La mutación C255G se encontró en una mujer de 63 años con historia familiar de hipercolesterolemia familiar. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 439 mg/dL y c-LDL 355

20 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

#### Análisis de la mutación E291X

Como esta mutación (934G>T, GAG>TAG, Asp291Stop) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada

25 que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción SspI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 164 pb del exón 6 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex6F (SEQ ID NO: 13) y el desoxioligonucleótido Mut E291XR (SEQ ID NO: 17).

30 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq



- 35 -

ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

5       Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de SspI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 pb (fragmento no digerido) para el alelo normal y de 144 y 20 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en  
10       geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87.

15       La mutación E291X se encontró en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un varón de 44 años con arco corneal con concentraciones de CT de 381 mg/dL, c-LDL de 314, TG 111mg/dL y c-HDL 45 mg/dL. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 12 puntos. El tratamiento hipolipemiante combinado con  
20       simvastatina (40 mg/día) y colestiramina (12 g/día) redujo su colesterol plasmático a 253 mg/dL y su c-LDL a 188 mg/dL.

#### **Análisis de la mutación 818del8**

25       Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 6 cuando existe mutación muestra la presencia de dos banda heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 179 y 171 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la  
30       formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas.

Adicionalmente, esta mutación puede ser caracterizada por digestión del producto amplificado correspondiente al exón 6 del gen del rLDL con la endonucleasa de

- 36 -

restricción MaeIII; quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 118, 34 y 27 pb para el alelo normal y de 118 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163.

La mutación 818del8 se encontró en una mujer de 69 años con dos hijos con cifras de CT de 382 y 304 mg/dL respectivamente y con evidencia de enfermedad cardiovascular prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 530 mg/dL, c-LDL 439 mg/dL, TG 170 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento con cerivastatina (0,4 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 363 mg/dL.

#### **Análisis de la mutación R279G**

Esta mutación R279G (898A>G, AGA>GGA, Arg279Gly) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 179 pb correspondiente al exón 6 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio A>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 y SEQ ID NO: 203.

- 37 -

La mutación R279G se encontró en una mujer de 59 años con xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia en padre y dos hermanos. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 384 mg/dL, c-LDL 314 mg/dl, con TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (80 mg/dl) redujo su concentración de c-LDL a 167 mg/dL.

#### **EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 7 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 234 pb del exón 7 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex7F (SEQ ID NO: 18) y Ex7R (SEQ ID NO: 19).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 57°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### **Análisis de la mutación 941-39C>T**

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción ApaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de ApaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 186, 26 y 22 pb para el alelo normal y de 208 y 26 pb para

- 38 -

el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91.

La mutación 941-39C>T se detectó en cuatro familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 61 años que había sufrido un infarto de miocardio y con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 340 mg/dL, c-LDL 248 mg/dL con TG de 136 mg/dL y c-HDL 65 mg/dL. Tras el tratamiento con 20 mg/día de atorvastatina el CT se redujo a 223 mg/dL y el c-LDL a 144 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

#### Análisis de la mutación C319Y

Esta mutación (1019G>A, TGC>TAC, Cys319Tyr) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción RsaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de RsaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 234 (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 136 y 98 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 95.

La mutación C319Y se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas tendinosos en tendón de Aquiles y en los tendones extensores de las manos y arco corneal y que tenía un hijo de 17 años con colesterol total plasmático de 384 mg/dL. Su padre había fallecido de muerte súbita a los 45 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia

- 39 -

familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 22 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 428 mg/dL, c-LDL 372 mg/dL, estando el nivel de TG dentro del rango de la normalidad.

5 **Análisis de la mutación 1054del11**

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron  
10 tenían un tamaño de 189 y 45 pb para el alelo normal y de 223 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99.

15 La mutación 1054del11 se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas aquileos tendinosos y con un familiar en primer grado con enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin  
20 tratamiento farmacológico fueron: CT 480 mg/dL, c-LDL 416 mg/dL, TG en 95 mg/dL y c-HDL 36 mg/dL.

**EJEMPLO 8: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 8 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 220 pb del exón 8 por la técnica de la reacción en  
25 cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex 8F (SEQ ID NO: 148) y EX8R (SEQ ID NO: 149).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq  
30 ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C

- 40 -

durante 1 minuto, hibridación a 64° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón  
5 anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### 10 Análisis de la mutación 1186+5 G>A

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 220 pb correspondiente al exón 8 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando  
15 los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex8BF (SEQ ID NO: 148) y Ex8BR (SEQ ID NO: 149).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio  
20 G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190 y SEQ ID NO: 191.

Esta mutación se encontró en dos familias no relacionadas con  
25 hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas era una mujer de 45 años que presentaba arco corneal, xantomas tendinosos, xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT)  
30 de 411 mg/dL, c-LDL de 346 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Cerivastatina (0,2 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 222 mg/dL.

- 41 -

**EJEMPLO 9: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 9 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 9 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex9F (SEQ ID NO: 20) y Ex9R (SEQ ID NO: 21).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación 1197del9**

Esta mutación se puede analizar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 9 en presencia de esta mutación muestra dos bandas heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las bandas homoduplex de 224 y 215 pb que pueden distinguirse en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103.

La mutación 1197del9 se encontró en ocho familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica

- 42 -

dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 45 años con xantomas tendinosos y que había tenido un angina de pecho a los 41 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 18 puntos. Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 36 años. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 525 mg/dL, c-LDL 443 mg/dL, TC 153 mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento con atorvastatina (20 mg/día) redujo su CT a 323 mg/dL.

#### Análisis de la mutación Y379X

Esta mutación (1200C>A, TAC>TAA, Tyr379Stop) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 87, 56, 34, 22, 18, 4, y 3 pb para el alelo normal y de 87, 56, 38, 22, 18 y 3 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, de esta forma se pudo distinguir las bandas de 34 y 38 pb que diferencian ambos alelos por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107.

La mutación Y379X se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de esta familia era un varón de 69 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 7 puntos. Su padre había fallecido de infarto de miocardio a los 50 años y tenía dos hijos con colesterol total plasmático por encima del percentil 95. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 306 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. Tras el tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (20 mg/día) su CT plasmático descendió a 259 mg/dL.

30



- 43 -

**Análisis de la mutación 1207delT**

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 140, 46, 35 y 3 para el alelo normal y de 140, 48 y 35 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, mediante tinción con bromuro de etidio se pudo distinguir las bandas de 46 y 48 pb que diferencian ambos alelos. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO. 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 111.

La mutación 1207delT se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 35 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 429 mg/dL, c-LDL 345 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 188 y 46 mg/dL respectivamente. El tratamiento hipolipemiente combinado con 40 mg/día de simvastatina y 5 g/día de colestipol redujo el CT a 220 mg/dL y el c-LDL a 137 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

**Análisis de la mutación Y421X**

Esta mutación (1326C>G, TAC>TAG, Tyr421Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 224 (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 164 y 60 para el alelo mutado: Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

- 44 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 115.

La mutación Y421 se encontró en tres familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 71 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y arco corneal. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 51 años y tenía un hijo con hipercolesterolemia acusada (CT 367 mg/dL). Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 615 mg/dL, c-LDL 550 mg/dL, con TC y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

#### **Análisis de la mutación 1204insT**

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 141, 45, 35 y 3 pb para el alelo normal y de 141, 45 y 39 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171.

La mutación 1204insT se encontró en una niña de 12 años cuyo padre presentaba unos niveles de CT de 412 mg/dl y su hermano de 7 años un CT de 321 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 332 mg/dL, c-LDL de 267 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con resinas (15 g/día) redujo su cifra de c-LDL a 248 mg/dL.

**EJEMPLO 10: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 10.**

Se amplificó un fragmento de 278 pb del exón 10 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes desoxioligonucleótidos Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23).

5 La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C  
10 durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ  
15 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación 1432delG**

20 Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción NaeI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 200 pb del exón 10 por la técnica de PCR  
25 utilizando el desoxioligonucleótido Ex10R (SEQ ID NO: 23) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut1432delGF (SEQ ID NO: 24).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq  
30 ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 46 -

durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de NaeI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 200pb (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 179 y 20pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119.

La mutación 1432delG se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y que había sufrido un infarto de miocardio, presentando además historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 548 mg/dL, c-LDL 470 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

#### 20 Análisis de la mutación T433N

Esta mutación T433N (1361C>A, ACC>AAC, Tyr433Asn) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

- 47 -

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 159.

La mutación T433N se encontró en un varón de 50 años con arco corneal y con historia paterna de hipercolesterolemia y una hija de 21 años con niveles de CT de 310 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 318 mg/dL, c-LDL 249 y con concentraciones de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con lovastatina (20 mg/día) descendió su cifra de c-LDL a 199 mg/dL.

#### **Análisis de la mutación T446I**

La mutación T446I (1400C>T, ACC>ATC, Tyr446Ile) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 y SEQ ID NO: 207.

La mutación T446I se encontró en una mujer de 64 años con antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 62 años) y con dos hermanos hipercolesterolémicos que habían sufrido un infarto de miocardio a la edad de 40 y 46 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina) fueron: CT de 352 mg/dL, c-LDL de 281 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. Posteriormente, el tratamiento

- 48 -

hipolipemiente con Simvastatina (20mg/día) se disminuyó su cifra de c-LDL a 150 mg/dL.

#### **Análisis de la mutación 1423delGC/insA**

5 Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MvaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de MvaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 150 y 128 pb para el alelo normal y de 128, 87 y 63 pb  
10 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 y SEQ ID NO: 167.

15 La mutación 1423delGC/insA se encontró en un varón de 34 años con historia paterna de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 554 mg/dL, c-LDL de 422 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento  
20 hipolipemiente administrado (Atorvastatina 10 mg/día) tan sólo disminuyó su cifra de c-LDL a 406 mg/dl.

#### **EJEMPLO 11: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 11 del gen del r-LDL.**

25 Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 11 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
30 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 49 -

durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### 10 Análisis de la mutación W515X

Esta mutación (1607G>A, TGG>TAG, Trp515Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 y 30 pb para el alelo normal y de 97, 67 y 30pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 123.

La mutación W515X se encontró en un hombre de 39 años con arco corneal, cuyo padre con hipercolesterolemia había tenido un infarto de miocardio a los 50 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 364 mg/dL, c-LDL 308 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. El padre del probando, dos hermanos y un hijo tenían cifras de colesterol por encima del percentil 95.

#### Análisis de la mutación [1587-5del5; 1587del31]

La mutación [1587-5del5; 1587del31] fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia

- 50 -

familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

5 Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta  
deleción se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% tras la que pudieron  
observarse bandas de 194 y 158 pb correspondientes al alelo normal y mutado  
respectivamente. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo  
10 descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 256, SEQ  
ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 y SEQ ID NO: 259.

La mutación [1587-5del5; 1587del31] se encontró en un varón de 43 años con  
arco corneal, historia de hipercolesterolemia en la familia (padre e hijo con  
hipercolesterolemia) y evidencia de enfermedad cardiovascular en la familiar (padre  
15 sufrió un infarto agudo de miocardio a los 50 años). El diagnóstico clínico de  
hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9  
puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico  
fueron: Colesterol total (CT) de 345 mg/dL con niveles de TG de 160 mg/dl y c-HDL de  
34 mg/dl. El tratamiento hipolipemiente combinada con Simvastatina (40 mg/día) y  
20 colestipol (10 g/día) disminuyó su cifra de CT a 208 mg/dl.

#### **Análisis de la mutación g516x**

Esta mutación (1609G>T, GGA>TGA, Gly516Stop) introduce un sitio de  
reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material  
25 amplificado del exón 11 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de  
30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los  
fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 139, 43 y 12 pb para el alelo  
normal y de 81, 58, 43 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por  
electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con  
30 bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo  
descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 176, SEQ  
ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179.



- 51 -

La mutación G516X se encontró en una mujer de 20 años con xantomas tendinosos e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre y dos hermanos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 476 mg/dL, c-LDL 403 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa disminuyó su cifra de c-LDL a 202 mg/dL.

#### 10 Análisis de la mutación H562Q

Esta mutación (1749C>A, CAC>CAA, His562Gln) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210 y SEQ ID NO: 211.

La mutación H562Q se encontró en una mujer de 37 años con historia de hipercolesterolemia y enfermedad coronaria en la familia (padre con hipercolesterolemia e IAM a los 48 años e hijo de 13 años con 500 mg/dl de CT). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 350 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 333 mg/dl.

**EJEMPLO 12: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 12 del r-LDL**

Se amplificó un fragmento de 236 pb del exón 12 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex12F (SEQ ID NO: 150) y Ex12R (SEQ ID NO: 151).

5 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C  
10 durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ  
15 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación E579D**

20 Esta mutación E579D (1800G>C, GAG>GAC, Glu579Asp) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 236 pb correspondiente al exón 12 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator  
25 Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex12F (SEQ ID NO: 150) y Ex12R (SEQ ID NO: 151). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la  
30 misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226 y SEQ ID NO: 227.

- 53 -

La mutación E579D se encontró en un varón de 49 años con historia de hipercolesterolemia en la familia (padre con 450 mg/dl de CT, hermano y dos hijos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 320 mg/dL, c-LDL 250 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (10 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 187 mg/dl.

#### 10 Análisis de la mutación 1815del11

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 12 cuando existe mutación muestra la presencia de bandas de heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 236 y 225 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187.

La mutación 1815del11 se encontró en 4 familias no relacionadas con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 69 años con arco corneal, evidencia de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 56 años) e historia de hipercolesterolemia en varios miembros de su familia (dos hermanos con CT de 700 y 435 mg/dL respectivamente). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Simvastatina, 40 mg/día) fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (30 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 225 mg/dL.

**EJEMPLO 13: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 13 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 13 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex13F (SEQ ID NO: 27) y Ex13R (SEQ ID NO: 28).

5 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C  
10 durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ  
15 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación D630N**

20 Esta mutación (1951G>A, GAT>AAT, Asp630Asn) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 89pb, 48pb, 39 pb, dos de  
25 14 pb y 11 pb para el alelo normal y de 89pb, 59pb, 39pb, dos de 14 pb y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126 y SEQ ID  
30 NO: 127.

La mutación D630N se encontró en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando era una

- 55 -

mujer de 36 años cuyos padres habían fallecido ambos de infarto de miocardio a los 62 y 64 años.

El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 332 mg/dL, c-LDL 268 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 81 y 48 mg/dL, respectivamente.

#### **Análisis de la mutación H635N**

Como esta mutación (1966C>A, CAC>AAC, His635Asn) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *CaiI* en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

Se amplificó un fragmento de 169 pb del exón 13 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex13F (SEQ ID NO: 27) y el desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas MutH635NR (SEQ ID NO: 29).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *CaiI* en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 151 y 18 pb para el alelo normal y de 169 pb para el alelo mutado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131.

- 56 -

La mutación H635N se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con arco corneal y sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. La madre y tres de sus hermanos presentaron concentraciones de colesterol por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 448 mg/dL, c-LDL 384 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

10 **EJEMPLO 14: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 14 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 288 pb del exón 14 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex14F (SEQ ID NO: 30) y Ex14R (SEQ ID NO: 31).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

**Análisis de la mutación D686Y**

La mutación D686Y (2119G>T, GAC>TAC, Asp686Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 288 pb correspondiente al exón 14 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un

- 57 -

termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex14F (SEQ ID NO: 30) y Ex14R (SEQ ID NO: 31).

5 Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 y SEQ ID NO: 219.

10 La mutación D686Y se encontró en un varón de 31 años con xantomas tendinosos, arco corneal, evidencia de enfermedad coronaria prematura (angor) e historia de hipercolesterolemia en la familia (padre y varios hermanos con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones  
15 plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 430 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente combinado con Atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gr/día) redujo su cifra de CT a 205 mg/dl.

#### 20 **EJEMPLO 15: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 15 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 243 pb del exón 15 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex15F (SEQ ID NO: 32) y Ex15R (SEQ ID NO: 33).

25 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante  
30 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón

- 58 -

anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

5

#### Análisis de la mutación 2184delG

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción AluI. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de AluI en un volumen final de 30 µl, según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos resultantes tenían un tamaño de 166 y 78 pb para el alelo normal y de 166, 67 y 11 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134 y SEQ ID NO: 135.

La mutación 2184delG se detectó en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 32 años con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 330 mg/dL, c-LDL 270 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

#### Análisis de la mutación T740M

Esta mutación (2282C>T, ACG>ATG, Tyr740Met) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NlaIII. Quince microlitros del material amplificado que incluía parte del exón 15 se hidrolizaron con 15 unidades de NlaIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 247 pb para el alelo normal y de 247, 194 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación



- 59 -

puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195.

La mutación T740M se encontró en un mujer de 60 años con arco corneal, historia familiar de hipercolesterolemia y antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre muerto de accidente cerebrovascular a los 34 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 492 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 251 mg/dL.

#### **EJEMPLO 16: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 16 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 273 pb del exón 16 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex16F (SEQ ID NO: 152) y Ex16R (SEQ ID NO: 153).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### **Análisis de la mutación V766E**

- 60 -

La mutación V766E (2360T>A, GTG>GAG, Val766Glu) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un  
5 termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex 16F (SEQ ID NO: 152) y EX16R (SEQ ID NO: 153). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>A observado se  
10 confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238 y SEQ ID NO: 239.

La mutación V766E se encontró en una mujer de 58 años con xantomas  
15 tendinosos en codos, xantelasmas, arco corneal, y con historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 12 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL de 324 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales.

20

#### **Análisis de la mutación I771T**

Como esta mutación (2375T>C, ATT>CACT, Ile771Thr), no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII en presencia del  
25 alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 142 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16R (SEQ ID NO: 153) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada MutI771TF (SEQ ID NO: 154).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con  
30 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

- 61 -

10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos. Quince microlitros del material amplificado de parte del exón 14 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 142 pb para el alelo normal y de 121 y 21 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

10 Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198 y SEQ ID NO: 199.

La mutación I771T se encontró en una mujer de 60 años con evidencia de enfermedad coronaria prematura en la familia e historia familiar de hipercolesterolemia.

15 El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 422 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y unos niveles de TG y c-HDL normales.

#### 20 Análisis de la mutación 2389+3 A>C

La mutación 2389+3 C>T fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System

25 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex16F (SEQ ID NO: 152) y Ex16R (SEQ ID NO: 153). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación

30 automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

- 62 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254 y SEQ ID NO: 255.

La mutación 2389+3 C>T se encontró en un varón de 36 años con xantomas tendinosos en tendón de aquiles y extensores de la mano e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre, hermano y un hijo con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 18 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) redujo su cifra de CT a 259 mg/dl.

#### **Análisis de la mutación 2389+4 A>G**

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxinucleoótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI en presencia del alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16F (SEQ ID NO: 152) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut2389+4 A>GR (SEQ ID NO: 155).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 16 se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 194 pb para el alelo normal y de 175 y 19 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al

- 63 -

8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182 y SEQ ID NO: 183.

- 5 La mutación 2389+4 A>G se encontró en once familias no relacionadas con herencia de la hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 22 años con xantomas tendinosos, antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre con hipercolesterolemia e infarto de miocardio a los 29 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación  
10 según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 356 mg/dL, c-LDL 293 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente combinado con atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gramos/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 227 mg/dL.

15

**EJEMPLO 17: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 17 del gen del r-LDL.**

- Se amplificó un fragmento de 242 pb del exón 17 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex17F (SEQ ID  
20 NO: 34) y Ex17R (SEQ ID NO: 35).

- La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 300 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:  
25 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

- Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón  
30 anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia

- 64 -

de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

#### **Análisis de la mutación 2399del5ins4**

5           Esta mutación elimina la secuencia TCTTC e inserta la secuencia GGGT en la posición 2399 creando un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Ava*I. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *Ava*I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos  
10           resultantes tenían un tamaño de 230 y 12 pb para el alelo normal y de 183, 46 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID  
15           NO: 138 y SEQ ID NO: 139.

          La mutación 2399del5ins4 se detectó en tres familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 49 años con xantomas tendinosos y cuyo padre había fallecido a los 51 años de infarto de miocardio. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó  
20           una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 510 mg/dL, c-LDL 424 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 140 y 58 mg/dL respectivamente. El tratamiento farmacológico combinado con simvastatina 20 mg/dL y colestipol 20 g/día redujo su colesterol total plasmático a 280 mg/dL. Por otra parte, dos hijos suyos de 22 y  
25           20 años tenían cifras de colesterol de 330 y 386 mg/dL, respectivamente.

#### **Análisis de la mutación 2544insC**

          Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 17 del gen del rLDL al analizar este fragmento en  
30           pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman

- 65 -

Coulter, Palo Alto, CA, USA) con los cebadores Ex17F (SEQ ID NO: 34) y Ex17R (SEQ ID NO: 35) la posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246 y SEQ ID NO: 247.

La mutación 2544insC se encontró en un varón de 37 años que había sufrido un infarto de miocardio, xantomas tendinosos, arco corneal, e historia de hipercolesterolemia en la familia (su padre falleció prematuramente de infarto de miocardio). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 379 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (40 mg/día) redujo su cifra de CT a 282 mg/dL.

#### Descripción de las figuras:

**Figura 1:** Esta figura es una representación esquemática de la ruta celular que sigue el r-LDL. El r-LDL se sintetiza en el retículo endoplásmico como una proteína precursora de 120 Kilodaltons y es transportado al aparato de Golgi. Una vez que es transferido a la superficie celular el receptor reconoce a la apolipoproteína B que es el componente protéico de las LDL. La unión conduce a la captación, internalización y degradación liposomal por el proceso denominado endocitosis. Esta captación permite satisfacer las necesidades de colesterol de la célula e induce a la supresión de la síntesis endógena de colesterol.

**Figura 2:** La figura representa los cinco dominios estructurales de la proteína del receptor LDL humana y su correspondencia con los exones del gen.

**Figura 3:** Portaobjetos de cuantificación de imagen con 4 cebadores (2 normales y 2 mutados) repetidos en 10 pocillos para la mutación E256K. (A) individuo normal (B) individuo con hipercolesterolemia familiar.

- 66 -

**REIVINDICACIONES**

1.- Secuencia génica correspondiente a SEQ ID NO:1 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG, 231delC, 2399del5ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39C>T, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31], de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

2.- Secuencia génica según la reivindicación 1 que comprende además, alguna de las siguientes mutaciones: 2393del9, (-42)C>G, (-49)C>T, 1045delC, 1061-8 T>C, A378T, C358R, 1358+1G>A, 1706-10G>A, 1845+1G>C, 2085del19, 211delG, 2140+5G>A, 2207insT, 2390-1G>C, 313+1G>C, 313+1G>A, 518delG, 7delC, 872delC, 884delT, 920ins4, A519T, C113W, C255X, C281Y, C297F, C347Y, C371X, C646Y, C677Y, C68W, C74G, C95R, D151N, D200G, D200Y, D280G, E10X, E246A, E256K, F634L, G322S, G352D, G571E, N543H, N804K, Q12X, Q133X, Q357P, Q427X, Q71E, R395Q, R574W, R612C, S156L, S205P, T413K, T705I, V502M, W(-18)X, W541X, D679E, 1359-1G>A, C127R, 681ins21, C122X, V408M, G528D, D412H, N619N, E80K, L534P, L621S, C356Y, R329X, G248D, C201Y, 313+5G>A, C358Y, C331R, D157N, V776M, P664L, W462X, Q328X, L584P, R395W, G314V, W469X, P678L, R612H, R236W, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

3.- Secuencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende, además, alguno de los siguientes polimorfismos: 81T>C BstUI Exón 2, 1060+10G>C SmaI Exón 7, 1171G>A StuI Exón 8, 1413G>A DdeI Exón 10, 1617C>T BstNI Exón 11, 1725C>T SSCP Exón 12, 1771C>T HincII Exón 12, 1959 T>C AvaII Exón 13, 2232G>A MspI Exón 15, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

4.- Uso de la secuencia génica de la reivindicación 1 en el diseño y la preparación de sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con alguna de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT,



- 67 -

2184delG, 231delC, 2399del5/ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39 C>T, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31].

5.- Sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con cualquiera de las mutaciones comprendidas en la secuencia génica de la reivindicación 1.

6.- Sondas oligonucleotídicas según la reivindicación 5 seleccionadas entre al menos unas de las siguientes SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, o al menos una de entre SEQ ID NO: 37 a la SEQ ID NO: 147 o de entre SEQ ID NO: 154 a SEQ ID NO: 259.

7.- Uso de las sondas de la reivindicación 5 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

8.- Uso de las sondas de la reivindicación 6 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

9.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de la reivindicación 5, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

10.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de las reivindicación 6, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

11.- Uso de algunas de las sondas seleccionadas entre: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO:

- 68 -

151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

12.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que comprende un soporte al que se acoplan además alguna de las sondas seleccionadas entre:  
5 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID  
10 NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

13.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las  
15 mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1.

14.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguna de las mutaciones de dicha SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 2.

20 15.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguno de los polimorfismos de dicha SEQ ID NO:1, descritos en la reivindicación 3.

16.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 13 a 15 que comprende  
25 amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólo o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxiligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 259 o combinaciones de los mismos, sometiendo los productos  
30 PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP.

- 69 -

para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9, 10 ó 12.

1/3

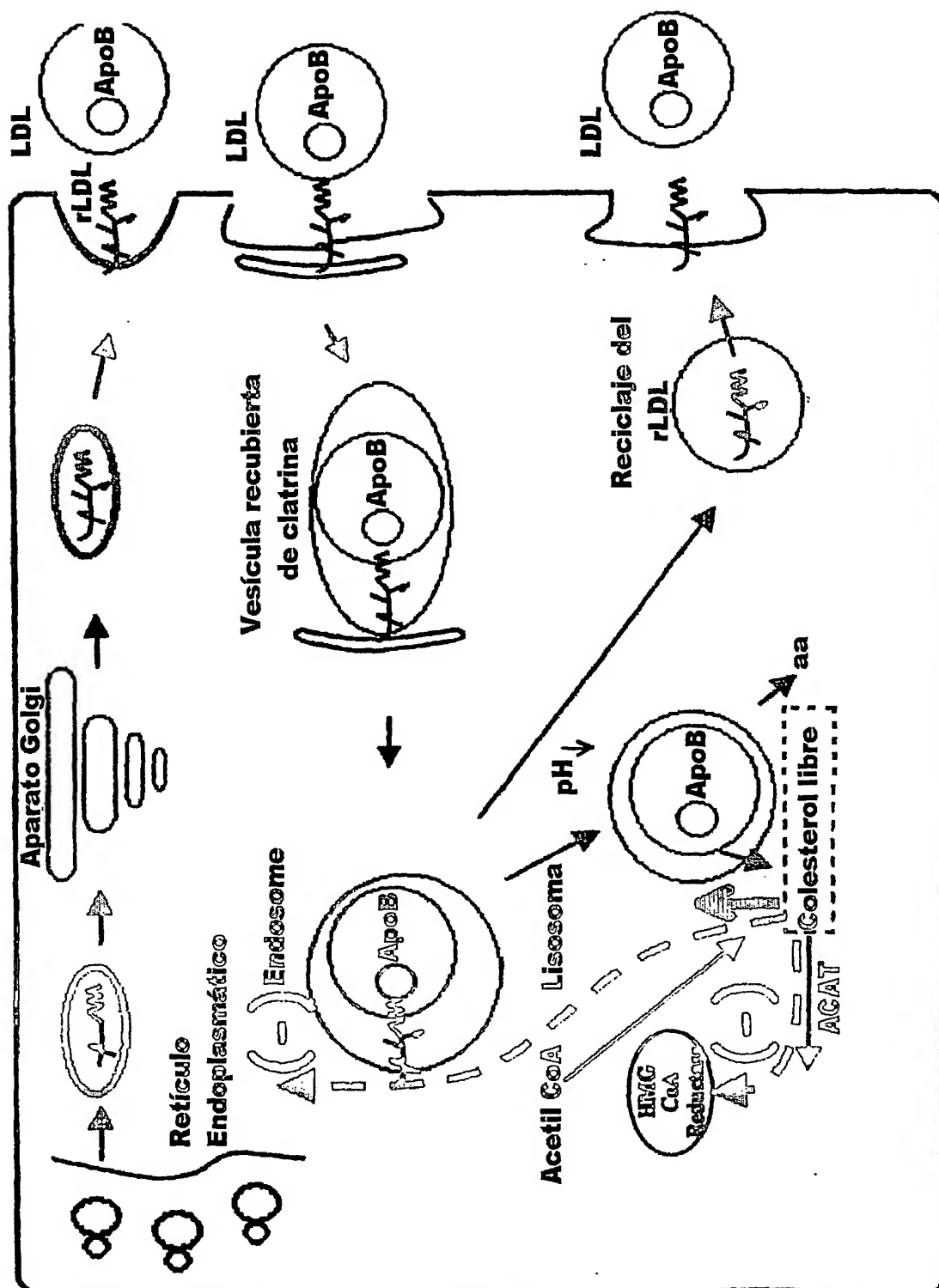


FIG. 1

2/3

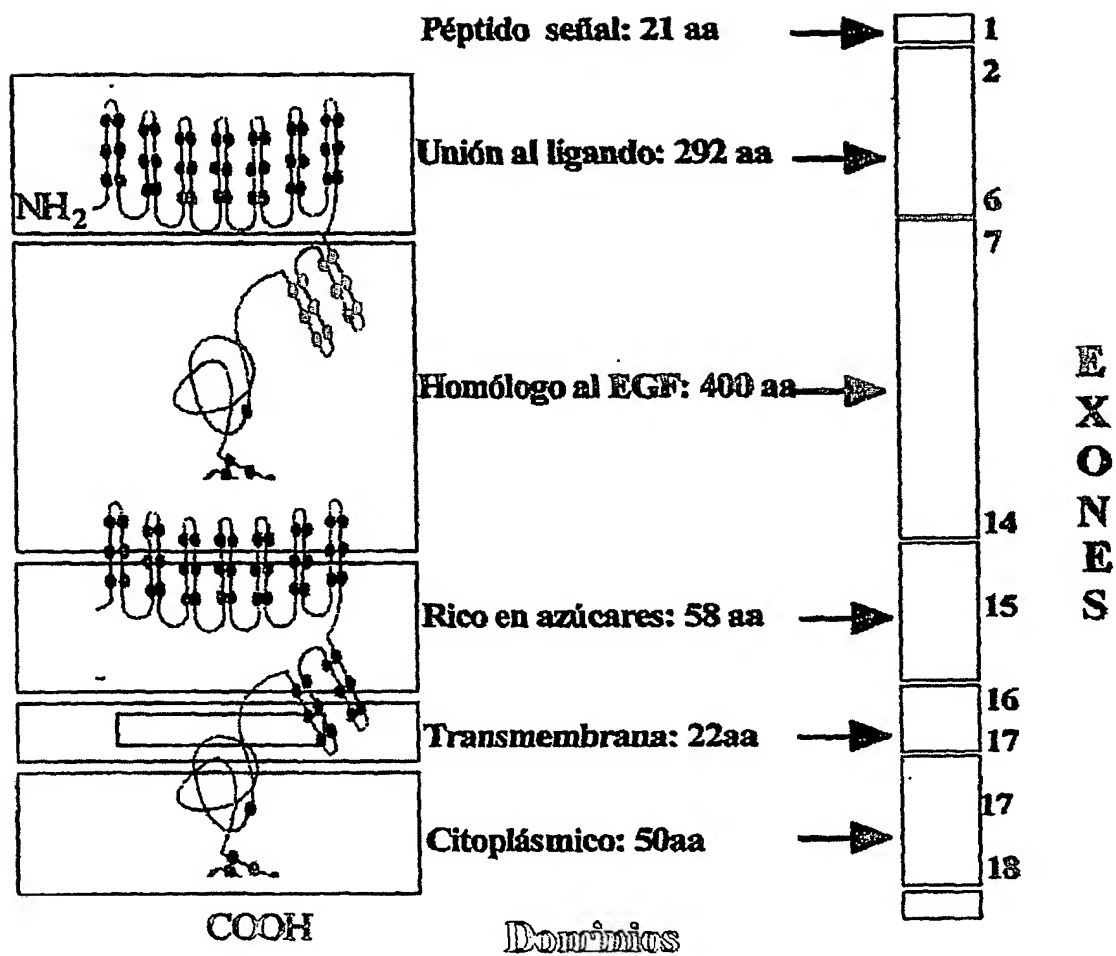


FIG. 2

3/3



**B**

MUTADO 2  
NORMAL 2  
MUTADO 1  
NORMAL 1



**A**

**FIG. 3**

- 1 -

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; EFARMES, S.A.

<120> "PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR".

&lt;130&gt; PCT-154

&lt;160&gt; 259

&lt;150&gt; ES200300206

&lt;151&gt; 28.01.03

&lt;150&gt; ES200302671

&lt;151&gt; 17.11.03

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 1

&lt;211&gt; 60.000

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; humano

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gen

&lt;223&gt; rLDL

&lt;400&gt;

```

aaaagatggt gtatccattc aatggaacat tatttggcct ttaaaaggaa ggaaattctc 60
actgagcata gtggtttatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggctgag gcagggggga 120
gggggcggtt cacctgaggt caggagttca agaccagcct ggccaacatg gtgaaatccc 180
gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gagtgtggtg gcacacacct gtaagccagg 240
ctacacggga gactgaggca ggagaatcgc tggaaaccgg.gaggcagagg ctgcagagag 300
ccgagattgc gtcactgcac tccagcctgg gtgacagagc gagactcttg tcttaaaaaa 360
aaaaagaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aagttctgac acaggctcca acacagatgt 420
tatgctcagt gaaataagcc agacatgaaa ggacaaatac tgcctgatct cattcataag 480
aggtccctag aattgtagaa tgggtgtgtg cacgggctgg gagggggtgt ggccagagtt 540
tcagtttggg aagttgagaa tgttctggag atggatggcg gtagtggtgg ttgcacaact 600
gtgtgaatgc gcttaatgcc tctgaattgt gcagttacaa gtgggttcgga tgggccgggc 660
gcggtggctc atgcctgtaa tcccagcaact ttgggaggcc gaggcaggtg gatcatgaga 720
tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc catctctact aaaaaataca 780

```

- 2 -

aaaaattagc caggcatggt ggtgggcacc tgtagtccca gctacttggg aggcggaggc 840  
aggagaatgg cgtgaacacg ggaggcagaa cttgcagtga gccgagatca cgccactgca 900  
ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctaaaaaaa aaaaagtggg taagatgggc 960  
cgggcatggg ggatcacgct tgcaatccca acactttggg aggctgagggt ggggtgattac 1020  
gaggtcagga gttcgagacc agcctgacca ccatggtgaa accccgtctc tactaaaagt 1080  
acaaaattag ccgggtgtcg tggcacacgt ctgtaatccc agctactggg gaggctgagt 1140  
tgggaggatc acctgagccc agggagggtcc aggctgcagc aagccatgat tgcaccactg 1200  
cactccagcc tgggtgagag agtgagaccc tgtctccaaa caaacacaca tgaaaaacag 1260  
atTTTTTTTg ccagggtgag tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg gaggccaagg 1320  
cgggtggatc acgagggtcag gtgactgaga gcatcctggc taacacgggtg aaaccctggc 1380  
tctactaaaa atacaaaaat ttagccgagc atgggtgggtg gcacctgtag tccragctac 1440  
tcgggagggt gaggcaggag aatggcatga acctgggagg cggagcttgc agtgagctga 1500  
gatcacgcca ctgcactcta gcctggggga cacagcaaaa ctgtctcaaa aaaaaaaaaa 1560  
aaggTTTTTT taatttaaaa aggaaagaaa aggagagtgc tcgtgtggca ggcacctagc 1620  
cctgtccagc gcaccctgag acagggtatga tgtctcctcc ttgacctag accacaagtt 1680  
ctaaccaatt caaccgagga cagagcccca attccaggca gggcaatggg gtgccttgt 1740  
gaactaagat gcagatggag aagagcagac acagacacag gtcttggggc ccctgcaggg 1800  
gtttctcact ggctttttcc ccctggattc ctatgggttc tggggaacag agttaggtcg 1860  
gctggcaaga cagatgcatg aggtgtgtgg gcccttgaca ttgagccgga gggccagagt 1920  
tcgtcattgc tgacgcagag aagctgggag ccaaggtag ccagatgggt tggaggagt 1980  
ttaaacaatc ttttcttttc tttctctttc catctgtctg tccttctttc ctcccttct 2040  
gccccctttc ttttctcttc tctttctctc ctctctctct cctccctttt tttctttttt 2100  
tttggttttc tttttgtatt agtattatta ttttttagac agggctcttg tctgttgccc 2160  
aggctggagg gcagtggcac gatcacagct cagtacaccc tcaaccttct gggttcaagc 2220  
aatcctcctg ccttggcctc ccaggtagct gggactacag gcgtgtgcca ccacacctgg 2280  
ttaatttttt ttttttttga gacggagtct tgcctctgtc cccaggctgc agtgacgtgg 2340  
cgtgatctcg gctcactgca acctccacct ccggggttca agcgatcctc ctgcctcagc 2400  
ctcccagata gctgggatta cacgcgcccg ccaccaagcc cggctaattt ttttattttt 2460  
agtagagaca gagtttcacc acgttggcca ggctcgtctc aaactcctga cttagtgatc 2520  
taccacactt ggcctctcaa agtgctggga ttagaggcgt gagccaccat gcgcagccaa 2580  
tttttgtatt ttttagtagag atggggtttc accatgttgg tcagtctggg ctcgaaactcc 2640  
tgacctcaag tgatccacct gcctcagcct cccaaagtgc tgggaattaca ggcagtagcc 2700  
accgcgcca gccctcttaa ccatttttaa gtgcacagtt cagcagcatt aagcacattc 2760  
acattgttgt gcaaccatca gccccgtcc atctccagct ttctcttttt ttttgtttgt 2820  
tttgagacag ggtcttactc tctcgcccag tatagagtgc agtggtgagg tcttggtctg 2880  
ctgcaacctc tgcttccag gttcaagcta ttctcctgcc tcagtctccc cagtagctgg 2940  
gattacagac acacatcacc acgcccgtgt aattattttg catttttagt agagatgggtg 3000  
tttcaccata ttggccaggc tgatcttgaa ctccctggcct caagtgggtc gtcctaaact 3060  
gctgagatta cagccgtgag ccactgctcc cagccatctg cacttttctc atcttcccaa 3120  
atgtaactat gtccccgtga aacactcact cccatttcca cctcccagc ccctggcacc 3180  
ccccatttta ttctggtgct aggggaattt caaaccaggc aagtctcaac acatgctcga 3240  
gtgtaagaac cagcccacag cctcgttccc taatcacggt caaaccagaa ttctactcca 3300



- 3 -

gggtctactc tgtgaatctg ctttctgtga atctgttact ctggggaccg cctataagtt 3360  
 gaatcctaca gtgtctccac ttcagtgact ggcttatttc acttttctcc tctttattta 3420  
 tgagacaaaa tttcgctctt gttgctcagg ctggaatgca atggcgtgat ctcggttaat 3480  
 ttttttgtat ttttagtaga ggcgggggtt caccatgttg gccaggcttg tctcgaactc 3540  
 ctgacctcag acgatccact ttggccttcc aaagtgcttg gattacaggc gcggcccacc 3600  
 tttctcctct taatcacaca ggtaatccat acatacgaca ttcttttttt tttttgacac 3660  
 ggagtcttac tctgtcacct aggtctggagt gcagtggcgc aatcttggt cactgcaacc 3720  
 tctgcctccc aggatcaagc aattctcctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag 3780  
 gtaaccatca ccacacctgg ctaaattttg tatttttagt agagacgggg tttcaccacg 3840  
 ttggccacgc tggatttgaa ctctgggtt caagtgatct tcctgtctcg gtctcccga 3900  
 gtgctgggat tacaggaatg agccactgtg cccggccaat acgacatctg tgcaatgaag 3960  
 tgcaacatat aagacaccct tccccaccc actgccccca ccaccgcccc caccgccccca 4020  
 ccccatctc cagatcagaa cctgggggtg tgcaatttta aacgttgtag ccacttgcta 4080  
 cttgggtagt tgaagttcag tctcagccag gttggagtcc tggactctgg cccctctttt 4140  
 atttttattt tttatttttt tttgagacag agtctcgctc tgtcgcccag actggagcgc 4200  
 agtggtgca tctcggtca ctgcaagctc tgctcctga gttcacgcca tcccccgcc 4260  
 tcagcctccc gagcagctgg gactacaggc gcccgccacc acaccggct aatttcttgt 4320  
 attttttagt agagatgggg tttcaccctg ttagccagga tggctagat ttcttgacct 4380  
 tatgatccgc ctgcctcggg cctcccaaag tgctgggatg acaggagtga gccaccgccc 4440  
 ccggcctctt tttttttttt tagacagtct ctgtcaccca ggctagagtg cgatggtgcg 4500  
 atctcggctc actgcaacct ccacctccg ggttcaagcg attctcctgc ctgagcctcc 4560  
 tgagtatctg ggattacagg tgcctgtgac caccgcccgc tgatttttgt attttttagta 4620  
 gagacggggt ttcaccacat tggtcaggct agcctcaaac tcctgacccc gtgatccttc 4680  
 cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggaactctgg cccatcttg ctgctgcca 4740  
 tgtccttctt tctatcttgg tttttccaca gttacgcaca tgccagataa cggcgagtct 4800  
 gttccccagc aactgcaacg gatctgcca ccaactggga atggaagacc ttgcagccca 4860  
 ggtcttttga gaccaagatt agattgtggt caacaaacac ctgaccttg cctttggaac 4920  
 catcagccat gtcagctaaa ataaaagcag aatctggctg ggcgcagtgg ctcacgcctg 4980  
 taatcccagc actttggggg gctgaggtgg gcagaccacc tgaggtccgg cgttctagac 5040  
 cagcctgacc aatatgatga aaccccgct ctactaaaca taaaaaatt agctgggcat 5100  
 ggtggcgggc acctgtaatc ccagctactc gggaggctga ggaaggagaa ttgcttgaa 5160  
 cctggaggca gaggttgag tgagccgaga ttgcgccact gcactccaac ctggactgca 5220  
 gaacaagact ctgtcccaaa agcagataaa taaaaataaa taaaaataaa aatatggccg 5280  
 ggcattggtg ctcacacctg taatcccaac actgggaaga tgaggcgggc agatcacgag 5340  
 gtcagggtt cgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca 5400  
 aaaattagcc gggcatgatg ctgcatgcct gtaatcccag ctactctgga ggctgaggca 5460  
 ggagaatcgc ttcaccccgg gaggtggagc ttgcagttag ctgagatcgc gccactgcac 5520  
 tctagcctgg gcaaaagagt gagactccat cgcaagaaaa aaaaaaaaaa aagctgcaag 5580  
 ctctgtctcc cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct tccaagtagc taggattata 5640  
 cgcgcccgc accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatgcg gtttcaccat 5700  
 gttggccagg ctggtctcaa actcctgacc tcacgtgac cacctgcctc ggccctccag 5760  
 agtgctggga ttacaggtgt gaaccctgc gcctggccaa gaaaagttgc ttgaatgaag 5820

- 4 -

agtaaataga agaccagaa agaaatgatt cgtccgagga aggtcacaga agcaacgtaa 5880  
 tcaagatgga aatctgactc ttcctaattt tggccagact tcccatccct ccaaagcttt 5940  
 ccagactcctt ccagatcatt ctagatatatt ccagaaatca ttcgtgaaat ctaactagga 6000  
 gtagtctgta aacaatgtgt ttcacacaga tacaattcat aaacgatgag aagaacaagga 6060  
 cacttcatga atgaaatttt tacggccggg tatgttggct cagcctata atcccaggac 6120  
 tttggaagac ccaggcagga ggattgcttg agtccaggag ttcaagacca gtctgggcc 6180  
 catagtga cctgtcgt acaaaaaatt taaaaattag gtagatatgg tgggtgatgc 6240  
 ctctagtttt agcttttttg gaggctgaag caggaggatc tottgagccc aggaggttga 6300  
 gctgcaatga gctacgattg aactactaca ctccagtctg ggtgacagag aaagaggctg 6360  
 cctcaaaaaa ataaaaataa aaaaataagg cgggacgcgg tggctcacgc ctgtaatccc 6420  
 agcacttttg gaggtgggg tgggcagacc acgaggtcag gagatcgagg ccatcctggc 6480  
 caacatgatg aaaccctgtc tctactgaaa acacaaaaat tagctgggcg tgggtggcgta 6540  
 tacctgtaat ccagctact cgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa ccaggaggtc 6600  
 agaggttgca gcgagaggag attgtgccac tgcattccag cctggcaaca gagcaagact 6660  
 ccgtctcaaa aaagaaacaa caacagcaac aacaacaaaa aaacataaa aaagttcggg 6720  
 cacggtggct cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggtgggt agatctcttg 6780  
 aggtcaggag ttcaagacca gcctggccaa caaacatggt gaaaccccgt ctctactaaa 6840  
 aatacaaaaa gtagccgggt gtagtccag ctactcggaa ggctgaggca ggagaatcgc 6900  
 ttcaacctgg gagatggaag ttgcagtga ctgagattgc gccactgggt gacagagtaa 6960  
 gactcttgct tcaaaaaaaaa aaaaagaaag aaagtttaat ttaatgattc aaataatgac 7020  
 ctgctcgaga gataaatata aagtctaacg taagagggtg atactttttc ctctgtcctg 7080  
 ctgtcctcgc ccacctcac cccaagtccc aacctgattg atcagtctcc tttccctctg 7140  
 gtagccccac tcccatgacc gaaccagaaa gtcatgcacc cgcataagaa ctctaatttt 7200  
 ttttttcaaa gtcttctcac tgccccaaaa atagtttctt tcattcccag gggatgtgaa 7260  
 agtgtctctc ccaattttat ttcaacctcc cagcgttcca cacatatgcc ttgcctcagc 7320  
 cagctttcac tgatctgcca tttccacctc ggcgtgctc ctacctggg aaatcctgtc 7380  
 catccatagt ctgatttctg ttgttccaga acattctttt ttttttcccc tggaacattc 7440  
 tttaagatac ctcaataaat gaaaccagag ggtatagagc agtatgaatg ggtactacaa 7500  
 tgtacagggg gaaatggagg ggaatatgat atactctcct ccttgatatat gcttagaatg 7560  
 ttctagaagg atatgcttaa aagggttagca gtccctggcca ggcgtgggtg ctacgcctg 7620  
 taatctcagc actttgggat gccaacgcgg acggatcaca aggtcaggag ttctagatca 7680  
 gcctgaccaa tatagtgaat cctcatcttt actaaaaata caaaaattag ccgggtacgg 7740  
 tggcatgtgc ctgtagtccc agctactttg gaacctgagg caggagaatc gcttgaaactc 7800  
 gggaggcaga ggttgacagt agccgagact gtgccattgc actgcagcct gggtagacaga 7860  
 acaggactcc gtctcaaaaa aaacaaaaaa aggtcagcag tcttaattgt cagagggcag 7920  
 gggacctgca tgggatggag gtttttccat gtgtccacct tttgagccct tttgcttttt 7980  
 ttttttaaat ctttttattg tagcaaaata gatataaat ttacctttt tttttttgag 8040  
 acagggtctc actctgttgc ccagggttga gtgcagtggc atgatcttgg ctactgcag 8100  
 cctctgcctc ctgggttcaa gcgattttcc tgccctcagcc tcccagtag ctgggattac 8160  
 aggtgcttgc caccataccc ggctaatttt gtatttttag tagagacggg gttacgcaa 8820  
 gttggccaag ctggctgcaa actcctgacc tcaagtgatc cgccccctc ggccctccaa 8280  
 agtgctggga ttacaggcag gagccaccac gctcagccct aaaatttacc atattaacca 8340

- 5 -

ttttcaagtt cagaggcatt aaagtatact cacattgttg ttcaactgtc accactactc 8400  
 acctgcagaa gtttttcatc ttgcaaagtg aaaaccccat acccaatttc cgttcttcc 8460  
 tctcagcccc tggtaatcac tattctactt tttgtctact ttttgtatga atttgcctat 8520  
 tctaggacct aatagaagtg gagtcaaacc tgtttgtcct tttgtggctg gcttatttca 8580  
 cccggcctta tatectcaag gtttatccat gttggaggat goctgaattt ccttgttttt 8640  
 aaggctaaat tttattctat tatattaata tgtcatattt tgtttatcct gatggacact 8700  
 tgggttgatt ccacctttgg ccattttgaa gaagcttcta tgtacatggg atacacatat. 8760  
 atctttgggt.ctctgctttc aatgcttttg.gggatatttc.agatgtggaa.tttctggatt. 8820  
 ataaggcaat.ttttttttt.gagacagact.ctcgtctcttg.tcgccaggc tagaatgtgg 8880  
 tgggtgtgatc tttttttttt ttttttttga gatggagtct cgctctgtcg cccaggctgg 8940  
 agtgcagtgt cagcatctca gctcactgca agctccgct cccagggtcg tgccattctt 9000  
 atgcctcagc ctoccaaagta gctgggacca cagccgcca ccacctcacc cggctaattt 9060  
 ttgtattttt agtagagaca gggtttact atgttggcca ggatggctc gatctcctga 9120  
 cctcgtgatc cgctgcctc ggcctccaa agtgctggga ttacaggcgt gagccactgc 9180  
 acccggtgg tgtgatcttg gctcgtgca acctctgct cccagggtca agcgattctt 9240  
 gtgcctcagc ctctccgag ctgggactac aggtgtgcgc cactgtgcc agctactttt 9300  
 taaaaatata tgtgtattta ttatactttt aagttctggg atacatgtac agaactgca 9360  
 ggtttgttac ataggtatac atgtgccatg gtggtttgct gcacccatca accggtcatc 9420  
 tacattaggt atttctcta atgctatccc ttccctagcc ctccactctc ccggtttttt 9480  
 gttttgtttt gttttgttgt tttgttttta gtagagacag ggtctacca tgttgcccag 9540  
 gctagtcttg aactcctgac ctcaagtgt ccgcccacct cagcctcca aagtgtggg 9600  
 attacagggt tgaccacta cactcggcct tatttttact ttttatgca attttacta 9660  
 ttgctatatt ctaggaggca ctgtggaatt gcactgtgga attttagtat tgctgtattt 9720  
 cagcaagcca tgaggtctgt cagcacacgg ctttgggcat tttgtgaaga taactgatgc 9780  
 cagctgagcc aaggcagggt cctgattcca cccactggca ggcaccgagg tctctgctgt 9840  
 tactgatggt ttctctgttg attgatggc ttaaggccag accacagctg caatggctca 9900  
 cctctgccaa aggcagggt cgttggggca gagacctatt ccggactgag cctcctggtg 9960  
 aattagagag gtagaaaatg ggaggacggg ggcagggtgg ctattacagc gaggaaaatg 10020  
 cccaccctga gttgtattag ataactttg gagttcagga actttccaat aaagtgggtt 10080  
 ccacagcagg attacttact gactccctaa tagaaagaag gcaggcacag gccgggcgtg 10140  
 ttggctcatg tctgtaatcc cagcacgttg ggaggctgag ggggtggat cacaaggta 10200  
 ggagatccag accatcctgg ctaacaaagt gaaacccgt ctctactaaa aatacaaaaa 10260  
 attaggctgg gcggtggtgc tcgtgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 10320  
 cggatcacga ggtcaggaga tcgagaccgt cctggctaac acggtaaaac cccatctcta 10380  
 ctaaacatac aaaaaaaaaat tagccagggtg tgggtggcgg cgcctgtagt cccagctact 10440  
 caggaggctg aggcaggaga gtggtgtgaa ctcgggaggc gcagcttgca gtgagccgag 10500  
 actgcgccac tgactccag cctgggcaac agacagagac tccgtctcaa aaaaaaaaaa 10560  
 aaaaaataca aaaaattagc caggcgtggt ggcacgtgca cgtgactgta gtcccagcta 10620  
 cttgggaggc tgaggcagga gaattgtttg aaccgggag acggagggtg cagtgagccg 10680  
 agatcgcgcc actgcactcc agcctgggtg acagagctag actccgtcaa aaaacaaaaa 10740  
 acaaaaaaca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa cagcaggaac tggcagggtc tccctgaaga 10800  
 gataaaaaaa aaaaaatgca gttgcaacac aaaagcagcc acagagaaaa gcaaaccat 10860

- 6 -

atatggtatt tattatgcac cgagtgtggc totaatcact tttttttttt taattgagag 10920  
 acagcctggc tctgttgatt gggctggagt gcagtggcgc gaccgtagct cattgcagcc 10980  
 tcaacctcct tggctcaagc aatcctccta cctcagcctc ctgagtagct gggaccacag 11040  
 gtgtgagcca ccacgcctgg ctaattgttt tttttttttt tgtagagaca gggctctact 11100  
 atgtggccca ggctggtttc caactcctgg gctcaagtga tcctcccacc tctgcctccc 11160  
 aaagtgtctg ggattacagg catgagccac ctgcctggc ctctagtcgc tttatatatt 11220  
 ttaacttaat cottacaaga gccctgtgag ctagttacag gagcacaaat ggaaaccaag 11280  
 aacagaaaa atttatcagc atgactcagt cctcagagcc atgtatggcc gtgtccgtgc 11340  
 atggcaggca ggtcaggggc ctggggaacg ctgttctgga aaccttggcc aggccttggc 11400  
 acccgaggaa tgtgcttttc agagtttttg tggctctttt ccagacctgc cctgacctct 11460  
 agctctggga actatgtaag ccaagtgcct tccgggaagg gagtccctct cctggtaact 11520  
 ctttctgggt aaccagatgt ggactcatga cacacactga gcctacgtct tataattttt 11580  
 tgtttttgtt tttagagacag ttccggtcct cttgcccagg ctggagtgc atggtgcgat 11640  
 ctgggtcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctccct 11700  
 agtagctgga attgcaggca tgcgccacca cgctggcta attttttgta tttttttttt 11760  
 tttagtagaa acgggggttc accttgtag ccaggctgggt caccaactcc tgacctcagg 11820  
 tgatccgccc acctctgcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagac agctgtgagc 11880  
 cacca'cgccc ggcgcatttt ttttttcttt tttttcagag ggagtgtccc tctgtcacc 11940  
 aggtgaagt gtagtggcgt gatctcgcc cactgtaacc tctatctccc aggttcaagt 12000  
 gattctcctg actcagcctc ccaagtagct gggactacag gcgcctgcta ccatgcctgg 12060  
 ctaatttttg tagtttttagt agaaaccggg ttttgccatg ttggccaggc tgggtctaaa 12120  
 ctcttgactt cagggtgatcc acctgccttg gccttctgaa gtgctgggat tatagggcat 12180  
 gagccactgt gactggccat cttaaatttt tttttttttt tttttttttt ttgagacagg 12240  
 gtttactct gtcgccagg ctggagtgc aaggcgcgat cttgggtcac tgcaagctcc 12300  
 gcctcctggg ttcatgccat tctcctgcct ctgcctcatg agtaactgag actacaggcg 12360  
 cccaccacca cgcccggcta atttttttgt attttttttag tagagatggg gtttcacctt 12420  
 gttagccagg atggtctcga tctcctgacc tcgtgatcca ccgtctcgg cctcccaaaa 12480  
 tgctggcatt acaggcgtga gccaccgcac ccagccttaa attttttttt aagggaatc 12540  
 aaaccctagt atattgggcc agtacagtgg ctcacacctg taattccacc actttgggag 12600  
 gctgaggcag gtgaatcacc tgaggtcagg agttcgagac cagcccggca aacatggcga 12660  
 aacccctgt ctactaaaaa taagaaaatt agccgggcgt agtggcatgc acctgtaatc 12720  
 tcagctactc gggaagctga ggcatgagaa tcgcttgaa ctgggagcag gacgttgcag 12780  
 tgaaccgata tcacaccact gactccagc ctgggtgaca gagcaagact ctgtctcaaa 12840  
 aaaaaaaaaga aaaaaaaatc cagtgatact tactttttta atttttatctt acttattttt 12900  
 tgctttaagt tgaatcttta aacttatctt tttttttgag acacagtctc actctgtcgc 12960  
 ccaggctgga gtgcagtgg acaaccacag ctgagtgcag cgttgacctc ctgggctcaa 13020  
 gccatcctcc cgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgcacac aaccatgtcc 13080  
 agcttatttt tgtatttttt gtagagacag ggtcccaactg tgttgccctg gcttgttctg 13140  
 aactcctagg ctcaagtgat ccccccgcct caccctcca aagtgtggg attacaggca 13200  
 tgagccacca catccagact tcactttttt gtttaatgtc gcaaattggca taaggaatgg 13260  
 gattcaatgg ggacacattt ataaacgttg cagcagctcc tagaacttgc ctatccttgt 13320  
 aaacttctct aggtgattgc taattacttc tttttttttt tttttttttg agacggagtc 13380

- 7 -

tcactctgtc gccaggtg gagtacagt ggcgaatctc gtctcactgc aaactccacc 13440  
 tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccgagt agctgggact acaggcacc 13500  
 gccaccacgc cgggctaatt ttttgtatct ttttttagta gaggtgggggt ttactgtgt 13560  
 tatccaggat ggtcttgatc tctgacctc gtgatccacc tgcctcagcc tcccaaagt 13620  
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcc agcccgttaa ttatttcaat ttgacctga 13680  
 cactgagcct gccaaagtagg ttcaagcatt ttgatggccc ctttacaggt tgggaaagct 13740  
 aatttatctg tccaaggccg aattctgaaa ctgagcttta actgccaaaa attcttatca 13800  
 tcaatttctt cttctgggtt gggcacagt gctcatgcct gtaaagccag caatttgaga 13860  
 ggcacatga tgcaagagga agaggattga gtgaagctag gagtttggga ccagcctggg 13920  
 caacatagt agaccccatc tataaaaaaa aattaaaaat tagttgggca tgggtgtgca 13980  
 ctctgtggt cctagctatt caggaggtc aggtgggagg attccttgag ccaggggtt 14040  
 acgctgcaga gagctgtgat cagccactg cagtcagcc tgagtgcag ctggaaataa 14100  
 tgataaataa ataataaata attattttaa aaattataat aaaaataatt aaaaaattat 14160  
 ttccctgat taatcttttt tttgtcctt ctgagagttc aatttgtccc tttctgcct 14220  
 ggtctcctag gtttccctaa aatcctgtc agaggttagc actgcctgcc aaagtcagtt 14280  
 tgcaaaatcc cagagaaatc cagcttattc ctgggggaac cgccaagact gccagccct 14340  
 gtgtgggggt caggcaagtt tctcacatgt gccttttttg caagaggcct ctggcaaccc 14400  
 catgagtc ccagagact caattctaaa agttgggtct caccagctct ctgtggctta 14460  
 ggggttcaag ttcaactgt aaagccctgt tttgtttga tttgtcttg agggagagga 14520  
 aaccgccctt ctgtttgtt aactccttct cctaagggga gaaatcaata ttacgtcca 14580  
 gactccaggt atccgtacaa ttgatttttc agatgtttat actcagccaa aggcgggatc 14640  
 ccacaaaaca aaaaatattt ttttggtgt acttttgtga agattttatt taaattcctg 14700  
 attgatcagt gtctattagg tgatttggaa taacaatgta aaaacaatat acaacgaaag 14760  
 gaagctaaaa atctatacac aattcctaga aaggaaaagg caaatataga aagtggcgga 14820  
 agttcccaac attttttagtg ttttctttt gaggcagaga ggacaatggc attaggctat 14880  
 tggaggatct tgaaaggctg ttgttatcct tctgtggaca acaacagcaa aatgttaaca 14940  
 gttaaacatc gagaaatttc agggagatct ttcagaagat gcgtttccaa ttttgagggg 15000  
 gcgtcagctc ttcaccggag acccaaatac aacaaatcaa gtcgcctgcc ctggcgacac 15060  
 tttcgaagga ctggagtggg aatcagagct tcacgggtta aaaagccgat gtcacatcgg 15120  
 ccgttcgaaa ctctcctct tgagtgagg tgaagacatt tgaaaatcac cccactgcaa 15180  
 actcctcccc ctgctagaaa cctcacattg aaatgctgta aatgacgtgg gccccgagt 15240  
 caatcgcggg aagccagggt ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc gggtcgggac 15300  
 actgcctggc agaggctgcg agc atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc 15350

met gly pro trp gly trp lys leu arg

-21 -20

-15

tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc gcc gcg gcg ggg act gca g gtaaggcttg 15400  
 trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly thr ala v

-10

-5

-1 1

ctccaggcgc cagaatagggt tgagagggag cccccggggg gcccttggga atttattttt 15460  
 ttgggtacaa ataactactc catccctggg agacttgttg ggtaatggca cggggctcct 15520  
 cccaaacggc tggagggggg gctggagggg ggcgtgagg ggagcgcgag ggtcgggagg 15580  
 agtctgaggg atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg 15640

- 8 -

gaccgcatct tctttgagac ggagtctagc tctgtcgccc aggatggagt gcagtggcac 15700  
 gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc gggtttaage gactctcctc tctcagcctc 15760  
 ccgaatagct gggattacag gcgcccgaacc accacgcccg cctaattttt gtatttttag 15820  
 tagagacggg ttttcacat tttggccagg ctggtctcga accccgacct caggtgatct 15880  
 gcccaaaagt gctgggatta caggcgtcag ccaccgcgcc cggccgggac cctctcttct 15940  
 aactcggagc tgggtgtggg gacctccagt cctaaaacaa gggatcactc ccacccccgc 16000  
 cttaagtcct tctgggggag agggcgactg gagaccgga tgtccagcct ggaggtcacc 16060  
 gcgggctcag ggtccccgat ccgctttgag cgaccccgag gcgccactgc catcctgagt 16120  
 tgggtgcagt cccgggattc cgccgcgtgc tccgggacgg gggccacccc ctcccgcccc 16180  
 tgccccgcgc cctttggccc gcccccgaa ttccattggg ttagtccaa caggccaccc 16240  
 tcgagccact ccccttgtcc aatgtgaggc ggtggaggcg gaggcgggag tggggaggac 16300  
 ggggcttgtg tacgagcggg gcggggctgg gcggaagtc tgagcctcac cttgtccggg 16360  
 gcgaggcgga tgcaggggag gcctggcgtt cctccgcggt tctgtcaca aaggcgacga 16420  
 caagtcccg gtccccggag ccgcctccgc gacatacag agtcgccctc cgttatcctg 16480  
 ggccctcctg gcgaagtccc cggtttccgc tgtgctctgt ggcgacacct ccgtccccac 16540  
 cttgtcctgg ggggcgccct cgccccacca gccccgatca agttcacaga ggggcccccg 16600  
 gccacccca aggcctcggg tcttacgag gttgaaacgt tgcctcagaa tctccccgcc 16660  
 cctccttggt ctgcagccga gatcttcagc cacgggtggg cagctatccc ccgggaccga 16720  
 cccctgggg tggcctcgct tcttcagagg ctgtgaatgg cttcggttca gctgtccaag 16780  
 cggcgatttt tctctgggt gaaatggatt agattttaga ttccacaag aggcgtggtta 16840  
 gtgcatgac ctgagttaga gcttttttag tggcttttaa ttagttgcag agagacagcc 16900  
 tcgccctaga caacagctac atggcccttt cctcctgag aaccagccta gcctagaaaa 16960  
 ggattgggat tgcctgatga acacaaggat tgcaggaaac ttttttttta attggcaagg 17020  
 gggttggctt tgactggatg gagagctttg aactgccttg aaattcacgc tgtaactaac 17080  
 acaccagttt cctctgggag gccagagagg gagggagggt gtaatgaaat acggatgatt 17140  
 gttcttttat ttttatttac ttatttattt ttttaacttt ttagagatg aggtctcgct 17200  
 tggttgctca ggctggtcct gaactcctgg cctcaagcga tctcctacc tcagcctccc 17260  
 aaagtgttg gattacagga gtgagccacc gcgccccacc ggggatgatg atgattgcaa 17320  
 acattctgcc actcagtttt acaaaagaaa gagaggcact ggattaatgt gtatctcact 17380  
 caccaatcaa cctcttctt aagagaaaat gtttaaggag tcttaggcaa ggccttggtt 17440  
 gttcatcact ttagtttctc tctcccgga tggctgagaa tgtgatgtt cctctgttgt 17500  
 caaggagact acaccctga tgttttctc cagacttctg agagctggtg tgtgtttcta 17560  
 gcactttcta gctgcaccac ctacgcgtgt agctggcttc aaggcatatc caggggggag 17620  
 tttcttgtcc atttcctta caaagggaag ttgttggaat ctgaaccgca agccttact 17680  
 tagacaaaa tcaggcaaca gcggtgagcg cagctccaaa cgtgtcaatg actacccaa 17740  
 atttgagtaa gggagtggc tgctttaacg agccgcaggg tgattccctt gtcatttccg 17800  
 gaaataccta tcttcaggg aacactggga aaaaacaggg agaccttgt tgagacagaa 17860  
 aacctgtagg ggaattctgt tctcattcc tgccttctc ttagacttc ctccctgata 17920  
 agatccaatt ctagatgggt cggttgctcc ttgctttgat ggggtgcttg atgggcttta 17980  
 ttattattat tattattatt attattattt tgatgggctt tttgatgtcc cttttccttc 18040  
 cacactctgt ccaactgtc aagcaaatag cttttgttg ctaagagact gcagatgtaa 18100  
 ccgaccagca gcaaacagtg agtcaggctc tctcttccgg aagcaaatc aattgctgag 18160

- 9 -

atcactctgg ggaaaatacc caccttattt ggaaagaagc actgatcaat tgatgtctat 18220  
 tttttttttt tttgagttgg agtctcgccc tgtcaccag gctggagtgc aatggcataa 18280  
 tctcgctca ctgcaatccc cgctcccg gttccagcaa ttctcctgcc tcagcctcct 18340  
 gagtagctgg aattataggc gcctgccaca acaccggct aatttttgta tttgtagtag 18400  
 agatgggggt tcaccacgtt ggccaggetg gtctcgaact cctgacctcg tgatccaccc 18460  
 gcctcagcct cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgaccc actgtgccag ccaatcaatt 18520  
 gatttctcat tcattttcag ctggctctgt tcccttaagc caggggattt tcgtttgttt 18580  
 gtttcccctt caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttcttgtac aactgttttc 18640  
 agtagcacag ggaaagaaaa catcgaaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa 18700  
 aaagcagaaa tgtgtattct ctttttttgt ttcatgacc ttgttctga cttgttactc 18760  
 gtgacttgag agatcagagg gctagaggac tagaatttat agaggtgttt tttttgtttg 18820  
 tttatttttg ttcatgttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctcaactgaa 18880  
 cctctgcctc ccaggttcaa gcgattcttc ggctcagcc tctgagtag ctggaactac 18940  
 aggcgcccgc caccacaccc agctaatttt tgtatttttc agtagagatg ggatttcacc 19000  
 atattggtca agctggcctc gaactcctga cctcgtgac caccgcctc agtttcccaa 19060  
 agtgctggga gtacaggcgt gagccgcgt gccggcctt tttgtgtttt tgtgtttttg 19120  
 agaggagctc attgcttttt aggcctccct agcgtgagaa aatctgggga tccatgctct 19180  
 agtttacttc cttttttttt ttttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaacttc 19240  
 agctcattgc aacttctgcc tccggggttc aagggtattc cgtgtctcag cctcctgggt 19300  
 agctaggata cgggcacccg ctaccatgcc tggctaattt tgtactttta gtagagacag 19360  
 ggtttcgcca cgttggccag gctgggtctc aactcctgac ctccaggtgag ccgcctgcct 19420  
 tggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgcttggcct aatttgcttt 19480  
 tctgaaatt caaatggtct aatatgaaa acgccaacct tgcttgaaag aataagaaag 19540  
 aggtgcgggt tcgttgggccc gttgatgttt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg 19600  
 gaaagggcag caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tcaactcagca ctgttcctgt 19660  
 cctgagcact gtcccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct 19720  
 ggctgcgcct gtggcagtaa aatctgcctt ttttttttgg aggcagggtc ttgcctgtc 19780  
 gctcaggctg aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagcttctgt actcaactga 18940  
 tctcctctc tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actcccacct 19900  
 cagtttgttt gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgcgt 19960  
 cccaggctgg agtgcaatgg cgcgatctcg gctcaccgca acctccacct cctgggttcaa 20020  
 gcgattctcc tgcctcagcc tctgagtag ctgggattac aggcattgcac caccacgccc 20080  
 ggctaatttt gtatttttcg tagagatggg gtttctccac attgggttcag gctgttctcg 20140  
 aactcccaac ctccaggtgat ccaccgcct cagcctccca aagtgtctggg attataggcg 20190  
 tgagcccccg aaccggccca ctcccagcta agtttaaat tttgtttgt ttgttcgttt 20260  
 gtttttattt tttgagacag agtctccgc ccaggctgga gcgcagatca ctgcatcctt 20320  
 gacctccag gcttaagcca tctcccccac tcagcctccc aagtagctgg gattacagg 20380  
 gtgtgccact atgcttggct aagttgtgta tttttttag agatgggggt caagggttgc 20440  
 tcgctttgtt gcctcggtt gtctcaaaact cctgggctca agcagtcctc cctcctcagc 20500  
 ctcccaagg gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagttg cccaggtggt 20560  
 agatcacaga aataggctcat cgtggggtcc ttcccatggg tgcagtcctg agccacctgt 20620  
 ggccagcaaa tatttggaga ataatagtca ggggagagct tgaggtccag ggaaagggtt 20680

- 10 -

tgtttttctt cagggaaagg tttttattgt tctttatccc tccttaaagg accttcaggt 20740  
 gttactgaca ttcccgtct acccagtggc acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtac 20800  
 agaggtaggg aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg 20860  
 gtgatcagag gctcctccct taagatcttg attgccaacg cctctggccc aactttcctt 20920  
 tttatttatc gcaagcctcc tggaatctca attgcttttt gccaccccg tgtgtcagca 20980  
 caagaaatga gtcatttcct cttttaagca cagttgaaat tgagctgtga gtcagtgagg 21040  
 tgtgtacgat attgtcaaag cgggggtgtg acagtattga cagatctgta gttgggcaag 21100  
 agaattatca gagtttgtga ccacagcaga ttccaaagct cgactcattt tcttctctct 21160  
 tccttccctt tttctttttc tttttttttt tttttttgac agagtctcgc tctgttgccc 21220  
 aggctggagt gcagtggcac aatctgggct cactgcagcc cctgcctcct gggttcaaatt 21280  
 gattctcatg tttcagcctc ccgagtagct gcaattacag gcattcgggt tcaagtgatt 21340  
 ctctgcctc agccacctga gcagtggga ttacaggcgc ccgccaccac gcccggttaa 21400  
 tttttgtatt tttagtagag acggggtttc accatgttgg ccaggctggg ctcgaaactcc 21460  
 tgaactcagg tgatccgccc acttcggcct cccaaagtgc tgagattaca gacgtgagtc 21520  
 accgcgcccc gccgtttctg ttctttaatt ctcaaaacac cctctaggaa gtagagactg 21580  
 ccattctccc ccattttaca gatcaggaaa ctgagtccca gaaggattta gtcagttacc 21640  
 caagttgttc tagttaaatg gcctggaaag ccagtgaagc ccaggattgt ctatctaacc 21700  
 cccttactac tctaactttc agggaaatcca catgaatgtg ctgggtcaac catcaaagtt 21760  
 gaaatggata aagggggctg gatgcgggtg ctgatgcctg taatcctagc actttgggag 21820  
 gccgagatgg gtgggtgat tgcttgagcc caagagttag agaccagcct gggcaacata 21880  
 gtgagacacc tgtctctgca aaaaataaat aaaaagttag ctgagtgtga tgggtcaccc 21940  
 ctctagtcac agctgttgag ttaggcttag gcaggaggat cgcatagaacc tgggaggtgg 22000  
 aggcggccgt gagcctcagt catgccactg cactccaacc tgggcaacag agtgaaagcc 22060  
 ggtgtccgaa agagaaagaa aaaaagacat agatacatct tttaaagtta ggttgtatgt 22120  
 taattaccta caactcagtt tcaactgtgc ttaaaggagg aaatgactca tttcttgcta 22180  
 catatcaaat tagcccaaaa ttagtggttg taaaacaaca catttatgat ttctcagttt 22240  
 ttgctgtgca ggaatttgga agcagcacag ctgacgggtt ccagctcagg gtctctcatg 22300  
 aagttgcaat caaaatattg gcaggagaga aaaacatatt ttcagaagct gcaggcatag 22360  
 gaagacttggt ctgggggttg aggatccact tccaagatgg cgactcagt ggctcttggc 22420  
 tggaggcctc agttccctgc tgcgtggagc tctccctcca gctgcttgag tggactcatg 22480  
 acatgcagct ggcctcccct ggagcagtcg atccaacaat gagcatggcc atgaactagg 22540  
 ctcagaagcc actccctgtc gtctctacat tttcctatca gaagcaagtc attaaaagtc 22600  
 cagtgccact ccaggggaga cgaattaggc tctgccttct gaaaggatta tcacagaaga 22660  
 tgcggtccta tattcttttt ttaaaattat tctttttttt attttgtaga gatgggtctt 22700  
 tggtagtttg cctaggccag tctggaattc ctgggctcaa acaatcctgt ctctgcctcc 22780  
 caaagtgttg ggattacagg catgagccac tgcacctggg catgtggtca tattttcttt 22840  
 ttcttttttt tttttttttg agacagagtc tctgtcggcc aggcaggagt atgggtggcg 22900  
 gatctcagtt cactgcagcc tccgcctccc gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc 22960  
 ctgagtagct gggattacag gcgcccgcca acatgccag ctaatttttt tagtagagat 23020  
 ggggtttcac catgttagcc aggatggctc cgatctcctg atttggtgat ccgcccacct 23080  
 tggcctccca aagtttcaac catcgatcag aacttattga tgtacttatg tagctaggca 23140  
 cgggtggcgog tgcctgtaat ccagctact tggaagggtt aaggcaggag aatcgcttga 23200



- 11 -

acctgggagg cagagggttac agtgagtcaa gatcatacca ttgcactcca gtctgggcaa 23260  
 cagaatgaga ctctgtctca aaaacaaaaa acaaacccctt gtatgtgatt ttcttgata 23320  
 gcatctgtta catcttcaca aagataaaaa gtcagacttg gctgggcatg gtggtcaca 23380  
 cctgtaatcc cagcactgag aggctgaggc aggagatca cttgagggtca ggaatttgag 23440  
 accaggctgg gcagcatggt gaaaccccggt ctctacaaaa aatacaaaaa ttagccgggt 23500  
 gtggtgtcac gcacctgtat tcccaagcta ctcaggaagc taaggcagga gaatcacttg 23560  
 aaccagagg tggaggtttg cagtgaattg agattgtgcc attgcactcc agcctyggcg 23620  
 acagagtgag actctgtgtc aaaaataaaa taaaataaaa ttttaaaaaa ggcagatttt 23680  
 tttttcttct tggattgtt accttattat agtaataata agtgcatagt gcatgctgag 23740  
 ataagcaatc ataatttggt attgcggccg ggcattggtg ctccagccta taatcccagc 23800  
 actttggtca ggagttcaag gccagcctgg ccaatatagt gaaactccat ctctactaaa 23860  
 atacaagaaa ttacctgggc atggtggcag ttgctggtga tccccagcta cttgggaggc 23920  
 tgaggcagga gaatcgcttg aacctgggaa gcagagggtg cagtgaacca agattgcacc 23980  
 actgcactcc agcctgggtg acagagtgag actctgtctg aaaataataa taataataat 24040  
 ttgttattgc ttttattgcc ttagtttaca tagggaatca aagtttatac tttgatttat 24100  
 aaaagttgct ttgattctag ttacagAAC cagaatcttt catataaagg tattagaggg 24160  
 cccagtgtgg tggctcatgc ctgtaatccc agcatattgg gaggctgagg agggaggatc 24220  
 actttaggag tttgaggcca gcctaggcaa catagtgaga ccttgtctct acaaaaaatt 24280  
 ccaacattag ctgggcatgg tggcatgtgc ctgtagtccc atttatttg ggggctgagg 24340  
 caggaggatc acttgagccc acgagggttca atccagggtg cagtaagcca tgatcctgcc 24400  
 actgcactcc agtttggtta acagagcgaa gotatgtctc aaaaaaagaa aaaaaagta 24460  
 ttctaaatcc aaatttaata tataaaacta aatgcaggcc aagtgtggtg gcatatacct 24520  
 ataatcaca cactttggga ggctgagggt ggaggattgc ttgagcccaa gagttcaaga 24580  
 ccagcctagg taacacagta agaccccatc totacaaaaa gtagaaaaat tagccaggca 24640  
 tgggtgtgag tgcttttaac cccaactact tagggggctg agatgggaag attgcttgag 24700  
 cctcagagtt tgaggctgca gtgggccgtg atcgctccac tgatcgctct aaagtgagac 24760  
 cctgtctcaa aaaaaaagaa aatagaagaa aactaaatac attcaataag actttgatct 24820  
 cttttccaag gtgtaaatat attttgggaa attttccagt tactttgttc tcattttaac 24880  
 gtaataatct aagtcttgggt tttctaagga aaagttttct cttattatat cttttgttaa 24940  
 tgtttctctc ccattttctt tgatctgac ttcagataca tgattatctt cactgctaaa 25000  
 tttgtgttct ctggcctcta catttataat ttctcataat totttatcta agtattttct 25060  
 ccctacctac tgaagaaaac tcaagttttc ttccacctta atgattatgc tgtgtctgtg 25120  
 agttttcttc atgactcttt acagtacaag ttttttgttt ttgttttttt aatggtcaga 25180  
 tggatagaac aacacagggt ttgtttgttt tgttttaact tttaaaaaaa ttataataga 25240  
 taaagggtct cactacgttg tccaggctga tctcactc ctgggctcaa gcaatccacc 25300  
 cacctctgcc tccaaagtg ctgggattac agtcatgagc caacatgcct gggcagtaca 25360  
 ggtttttttt gagacggagt tttgttcttg ttgccagggc tggagtgc aa tggcacaatc 25420  
 ttggctcacc acaaagtctg cctcccagggt tcaagtgatt ctccctgcctc agcctcctga 25480  
 gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac gccagctaa ttttgtattt ttagtagaga 25540  
 cggggtttca ccatgttggc caggctggtt tcgaactgct gacctcagggt gatctgcca 25600  
 cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag gcatgagcca ccatgccag ctgtagtaca 25660  
 ggttttaata tgctaaatc tcttccttc tttattaatg tgcatggaag ttctaataat 25720

- 12 -

```

tttttcccat accccagaga gtccatattt tggaatcaac aacactagcc tttgttgaca 25780
agtgtctctc ttgggttcct tctttgtgtc ctccactgaa ttttgggggt cataaaattt 25840
catttgttgt gcttgcttaa ttccctggga atcagactgt tctgatcgg atgacatttc 25900
tggttaattc tttagttggc aggaaataga cacaggaaac gtggtcagtt tctgattctg 25960
gcgttgagag accctttctc cttttcctct ctctcag  tg ggc gac aga tgc gaa 26014
                                al gly asp arg cys glu
                                5
aga aac gag ttc cag tgc caa gac ggg aaa tgc atc tcc tac aag tgg 26062
arg asn glu phe gln cys gln asp gly lys cys ile ser tyr lys trp
      10              15              20
gtc tgc gat ggc agc gct gag tgc cag gat ggc tct gat gag tcc cag 26110
val cys asp gly ser ala glu cys gln asp gly ser asp glu ser gln
      25              30              35
gag acg tgc t  gtgagtcctt tttgggcatg atatgcattt atttttgtaa 26160
glu thr cys l
40
tagagacagg gtctcgccat gttggccagg ctggtottga atttctggtc tcaagtgate 26220
cgctggcctc ggccctccaa agtgctggga ttacaggcac cacgcctggc ctgtgacacg 26280
attcttaacc cctttttgat gatggcggct ggaaaagtgg ccagtggatt ttgatgtatt 26340
caatcatgaa ttaggaggtg gggagagaat gaattattgg agctttcctt aaagccatta 26400
aatggctcta ttgttttttc aattgatgtg aatttcacat aacatgaaat taaccagctc 26460
agtggcatta atacatctgc aatgctgtgt ggccaccacc tctatcttgt tccaaaactt 26520
tgcataacct aatgtctttt tttttttttt tttttgagac ggagtctcgt tccatcacc 26580
aggctggagt gcagtgggtg gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc aggttcacgc 26640
catcctcctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcaccctcca ccacatccgg 26700
ctaatttttt gtatcttttag tagagatggg gtttcacat gttagccggg atgggtctcga 26760
tctcctgacc tcgtgatcca cctgcctcgg cctcccaaag tgctggcatt acaggcgtga 26820
gccaccatgc ccggcctatt ttttttttta agagatggag tctaattctg ttgccagggc 26880
tggagtccag tggtagcatc atacttcaact gcagccttga cctcttgggc tcaagtgatt 26940
ctcttgccct gaactcccaa agtattggga ttacagggtg gagccaccgc actcagccta 27000
atgtccagtt ttttaacaag tccattttaa tgccctcgt tttgacccat aaaggggtag 27060
gcttgggccg gcacaatggc ttgtgtctgt agtccagct acttgggagg ctgaggcaga 27120
aaggcagaaa gattgcttta taaagcccag gagtttgagg gccacctggg tggcatagct 27180
agacctcatc tctaaaaaat aagtaataaa taaatatttg tttttgtttt tttctttttc 27240
ttttcttttt tttttttttt tgagacggag tcttgctctg ttgccagggc tggagtgcag 27300
tggcgcgatc tcagctcact gcaagctgtg cctcctgggt tcatgccatt ctctgcctc 27360
agcctcccga gtagctggga ctacaggcgc ccaactaccac gccagctaa ttttttgtat 27420
tttttagtaga gatgggggtt caccacgtta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcgt 27480
gatccgccag ctttggcctc ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca ctgagccgc 27540
cccatatgta tgtatatata ttttttttta aaatgggaga ccaggcatgg tggctcatgc 27600
ctagaatccc agcacttttg gaagctgagg taggcggatc acttgaggcc atgagtttga 27660
gaccagcctg ctcaacatga tgaaacttct atctctacta aaaaaaaaaa tgggattagg 27720

```

- 13 -

tcaggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttca gaggccgagg caggaggatc 27780  
 atgaggtcag gagatcgaga ccatacctggc taacacgggtg aaaccccgtc tctactaaaa 27840  
 aaatacaaaa aattagccag gcgtgggtggc ggggtgcctgt agtcccagct actcaggagg 27900  
 ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggccggagctt gcagtgagcc aagatcgtgc 27960  
 cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaa aaaaaaagt 28020  
 ggattgacat tctcttcaaa gttctgggggt tttcctttgc aaagacagga ttggcaaggc 28080  
 cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac ccaggctgga 28140  
 gtgcaatggc aggatctcgg ctcaccgcaa cctcctcctc ccagggttaa gtgattctcc 28200  
 tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggtgcccgc caccacaccc aactaatttt 28210  
 tgtattttta gtagagacag ggtttcacta tattggccag gctggctctt aaccctgac 28320  
 ctcacgtgat ccaccgcct tggcctccca aagtgtctggg attacaggcg tgagccactg 28380  
 tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc ttctgtag tg 28440  
 eu  
 tot gtc acc tgc aaa tcc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac 28488  
 ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn  
 45 50 55  
 cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac 28536  
 arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp  
 60 65 70 75  
 aac ggc tca gac gag caa ggc tgt c gtaagtgtgg ccctgccttt 28581  
 asn gly ser asp glu gln gly cys p  
 80  
 gctattgagc ctatctgagt cctggggagt ggtctgactt tgtctctacg gggtcctgct 28641  
 cgagctgcaa ggcagctgcc ccgaactggg ctccatctct tgggggctca taccaagcct 28701  
 ctcccgccct tcaaatcccc ccttgaccag gaggcattac aaagtgggga tgggtgctacc 28761  
 tcttcggggt tgtcacgcac agtcaggag gctgtccctg ccgagggcta gccacctggc 28821  
 acacacactg gcaagccgct gtgattcccc ctggctcgtga tccccgtgat cctgtgatcc 28881  
 ccgccccgtg aggctgaaca catagtacg cttgctagcc aagcctcaat gaccacgta 28941  
 acatgaaggg ggaagccca gaaagtctc ccaaggagca aggccaagaa tcccgaaggg 29001  
 aaatggactt tgaagctggg cgtcttcttg gctgtcttaa tacaagtggc acatccaaat 29061  
 ccaaaacccc gaaattcaaa gtcttgagca ccgaaattc tgaaacgtct tgagcactga 29121  
 cctttagaag gaaatgctta ttggagcatt ttggatttcg gatttttacc actgagtgtg 29181  
 gagtccctaat taggaaaaaa accaggctga ccgaacaaaa ggaaagcaat aaaagaaggc 29241  
 agatagggtc aggcacgggt gctcaccct gtaatcccag ccttttgaga ggctgaggcg 29301  
 ggtggatcac ttgaggtcag gatttcgaga gcagcctggc caacacgggt aaaccuccatc 29361  
 tctactgaaa atacaaaaac tagccaggta tgggtggcgtc tgctgtaat ccagctact 29421  
 cgggaggctg agacaggaga atcacttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaat 29481  
 atcacgcat tgactccag cctgggggac aagagcga aaatctgtctca aaaaaaaga 29541  
 agaagaaggc cgacaaacta tgtaactctg ctttctcca tgggtccagaa cacacagccc 29601  
 tctgcgtaa ataactcctt atcttctgc tcccagctat catcagacac ctcggtgat 29661  
 agaaaattgc aagttagctc actgcaacct cggtattata agtactgcac aaagccctct 29721  
 tcagcgaca gcacaagcac cattctataa aatctccagc aagcggccag gtgcagtggc 29781

- 14 -

tcataacctgt aatcccagca ttttgggaga ctgaggcggg cggatcacct gaggtcagga	29841
gtttgagacc agcctggcca acatggtgaa acccgtctc tattaaaaat acaaaaaaat	29901
tagccaggcg tgggtggcagg tgctgtaat ccagctact tggaaggctg aggcaggaga	29961
atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttgca gtgagccgag atcttgccat cgcaactccag	30021
cctgggggac aagagtgaga cttcgtctca aaaaaaaaaa aaaaaattcc cagcaagcct	30081
ttgtcttctg gcagtcagct cctctcttgc tgacctgctc attgctttct tgcaagggtat	30141
tttctacct actttctgga ataaatctgt ctttctgtac ttacaactac ctttttttaa	30201
attttttct tttttgagat ggagtctcac tctgtttgcc caggctggag ttcagtgggtg	30261
caatctcagc tcaactgcaac ctctacctac tgggttcaag cgattctcct gcctcagctt	30321
cccagtagc tgggattaca ggcgtgcacc agcacgcagg ctaatttttg tatttttagt	30381
agagacgggg ttccaccatg ttggccaagg tggcttgaa ctctgacct caagtgatcc	30441
tcccacctca gcctcccaa gcgctaggat tacggccatg agccactgag gccggctgca	30501
cctacaactg tcttgataaa ttcttacctc cacacctg gtccagatag tcagtgtca	30561
cccacaacat taaggatatt ccaaatttga aacattccaa aatcagaaaa atattccaac	30621
tctgaaaata ttccaaaatc caaaaaaatt caaaatccaa aacacttctg gtcccaagca	30681
ttttagagaa gggatactca acccaaaata aggacagcaa ttctataaat tgtgtacca	30741
tcttgacagt ctcagtttaa cagctttaca cctattagcg caccagtgt catagcagt	30801
ctgggaaatg tgtacagatg aggaaactga ggcaccgaga gggcagtgg tcaagatcca	30861
tggccctga ctgctccca gccgccttt ccaggggcct ggctcactg cggcagcgtc	30921
cccggctata gaatgggctg gtgttgggag acttcacacg gtgatgggtg tctcggcca	30981
tccatccctg cag cc ccc aag acg tgc tcc cag gac gag ttt cgc tgc	31029
ro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys	
85 90 95	
cac gat ggg aag tgc atc tct cgg cag ttc gtc tgt gac tca gac cgg	31077
his asp gly lys cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg	
100 105 110	
gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg gtg ctc acc tgt	31125
asp cys leu asp gly ser asp glu ala ser cys pro val leu thr cys	
115 120 125	
ggg ccc gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc atc ccc cag ctg	31173
gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys ile pro gln leu	
130 135 140	
tgg gcc tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc tcg gat gag tgg	31221
trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu trp	
145 150 155	
ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg gac agt agc ccc	31269
pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pro	
160 165 170 175	
tgc tcg gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag tgc atc cac tcc	31317
cys ser ala phe glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his ser	
180 185 190	

- 15 -

agc tgg cgc tgt gat ggt ggc ccc gac tgc aag gac aaa tct gac gag 31365  
 ser trp arg cys asp gly gly pro asp cys lys asp lys ser asp glu  
                   195                                  200                                  205  
 gaa aac tgc g gtatgggagg ggccaggggtg gggggcggggc gtcctatcac 31415  
 glu asn cys a  
                   210  
 ctgtccctgg gctccccag gtgtgggaca tgcagtgatt taggtgccga agtggatttc 31475  
 caacaacatg ccaagaaagt attcccattt catgtttgtt tttttttttt cttttctttc 31535  
 tttattttgt ttttgagatg gagtctcact ctgtgatttt tttcatctct aaatttccta 31595  
 catccatatg gccaccatga ggcgccaggc tggccgatgg ttgctgttag cttattggga 31655  
 aatcactgtt tggaagggtgc tggttgtttt ttgttgtttg ttgtttttgt ttttgttttt 31715  
 gttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcca ggggtggagtg cagtggcgcg atcagctcac 31775  
 tgcaacctcc gcttcctggg ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca agtagcgcg 31835  
 attacaggca tgtgccacca cctccggcta tttttttttt tatttagtag agatgggggt 31895  
 tcacatgtt agtcaggctg gtcatgaact ctgacctca ggtgatccac ccgcctcggc 31955  
 ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgctgcacc cagccttttt ttgttttttt 32015  
 gagacagggt cttgctgtca cccagggtga agtaagggtg cacgattatg gctcactgcy 32075  
 gccttgatct ccttggtcga agcgatcctc tcacttcagc ctctcaagca gttggaacca 32135  
 caggctgtac caccaagcct ggccaatttt tttgtacaga cacaggctgg tcttgaactc 32195  
 ctgggctcaa gcaatcctcc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattcc aggcattgagc 32255  
 cgctgcaccc ggcaaaaaggc cctgcttctt tttctctggt tgtctcttct tgagaaaatc 32315  
 aacacactct gtctgtttt ccag ct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa 32365  
   la val ala thr cys arg pro asp glu  
   215  
 ttc cag tgc tct gat gga aac tgc atc cat ggc agc cgg cag tgt gac 32413  
 phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp  
 220                                  225                                  230                                  235  
 cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat 32461  
 arg glu tyr asp cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn  
                                   240                                  245                                  250  
 g gtgagcgctg gccatctggt tttccatccc ccattctctg tgccttgctg 32512  
 v  
 cttgcaaagt atttgtgaag ccagagggcg cttccctggt cagctctgca ccagctgtgc 32572  
 gtctgtgggc aagtgacttg acttctcaga gcctcacttc cttttgtttt gagacggagt 32632  
 ctgctctga caccaggct ggagtgtgtt ggcacaatca cagctcacgg cagcctctgc 32692  
 ctctgatgct cagtgattct cctgcctcag cctcccgagt agctgagatt aaaggcgtat 32752  
 accaccagc ccggctaatt tttgtattt ttattagaga cagggtttct ccatgttggc 32812  
 caggctggct ttgaactcct ggtctcagggt gatccacccg cctcggcctc ccaaagtgtc 32872  
 aggattacag gtgtgagcca ctgcgccagg cctaattttt ttgtattttt agtagagatg 32932  
 cggttttgcc atattgccca ggctggctc gaactcctgg gctcaagcga tctgcctgcc 32992  
 ttggcctccc aaagtgtgtg gattacaggc acaaacacc gtgcccagc cgttttctta 33052  
 atgaatccat ttgcatgcgt tcttatgtga ataaactatt atatgaatga gtgccaagca 33112

- 16 -

aactgaggct cagacacacc tgaccttccct ccttcctctc tctggctctc acag tg aca 33271  
al thr  
ctc tgc gag gga ccc aac aag ttc aag tgt cac agc ggc gaa tgc atc 33219  
leu cys glu gly pro asn lys phe lys cys his ser gly glu cys ile  
255 260 265  
acc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac tgg tca 33267  
thr leu asp lys val cys asn met ala arg asp cys arg asp trp ser  
270 275 280 285  
gat gaa ccc atc aaa gag tgc g gtgagtctcg gtgcaggcgg cttgcagagt 33319  
asp glu pro ile lys glu cys g  
290  
ttgtgggggag ccaggaaagg gactgagaca tgagtgtgtt agggtttttg gaactccact 33379  
ctgccccccc tgtgcaaagg gctccttttt tcatthttgag acagtctcgc acggctcgccc 33439  
aggctggagc gcaatggcgc gatcttggct caccacaacc tccggctccc aggttcaagc 33499  
gattcttctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag ctgaatgcca ccttgctggg 33559  
ctaatttttg tatttttagt agagatgggg ttccaccatg ttggccaggc tggcctcgaa 33619  
ctcctgacct cgagtgatct gcccgccctcc tgaagtgtct ggattacagg cgtgagccac 33679  
ctcgtccttg tgagggtttt tttttttccc caaccctctg tgggtggatac tgaaagacca 33739  
tattaggata actgtacagt atagagaagg cagtggcaag ttttctctgt catataccag 33799  
agtgggcttg ggcattggtg catactcctg tagtctcagc taatcaggag gctgaggaag 33859  
gaggatcgct tgggcccagg agttggagac tgtagtgagc tgtgatcaca ccaccacact 33919  
tcaatctggg caacagagca agagacccta tctctaaaaa aaagtaagta tttcggacac 33979  
tgtggggccat acggctctctg gtgcagtttc tcaacatggc tgttgggtga acacaaccac 34039  
gcacagaacg caaaccaata cacgtggctg tgggcccaga aaatgttatt tatggacaca 34099  
aaaattggaa tttcatataa ctgttttggt tcatgaaaat gatttccctt tttattttta 34159  
tttttcttct caagtattta aatatgtaa agccattttt aggcctggca ggatggttca 34219  
cagctgtaat cccagcactt tgggaggtcg aggcgggagg atcacgaggc caggagatcg 34279  
agaccatcct ggccaacaca gtgaaacccc gtctctacta aaaatacaaa aaattaacca 34339  
ggcttggttg cgcgcgtctg tagtcccagc tgctcaggag gctgaggcag gagaatcgct 34399  
tgaatgcagg aggcggaggc tgtagtgagc cgaggttgca ccaactgcact ccagcctgag 34459  
cgacagagtg agagtccgcc tcaaacaaaa aaatgtttgc ccatgctggt cttgaactcc 34519  
tgggctcaag ctatctgcct gccttgggtt cccaaagttc tgggattaca ggcattgagct 34579  
acagcgcccg gacttttggt gttttatata tatatatcta tatataactt gttttatgta 34639  
tatataaac ttgttttata tatatacata aactgcagta aaaaacatgt aacataaaat 34699  
ttacctctc aaaccttatt aagtgcacag ttctgtgcca ttagcaaatt cacactgttg 34759  
tacaacatca caaccacat ctccagaact tttttttttt tttttattct ttttgagaca 34819  
gagtctcact cgtcgacagg gctggagtgc agtggtgca tctcggttca ctgcaacctc 34879  
cacctaccag gttcaagcaa ttctcctgcc tcagccccct cagtagctgg gattacaggt 34939  
gcccgtccta ccacgccag ctaatttttg tattttcagt agagactgac tgggtttcac 34999  
catgttggcc aggcgtgtct cgaactcctg acctcaagtg atcctccac ctcagcctcc 35059  
caaagtgtg ggaatacagg catgagccac tgcgcccggc ccagaactc ttttatcttc 35119  
ccaaactgaa gctctgtccc catgaaacac tcaactctcca tccctcccc aactcctggc 35179

- 17 -

acccaccatt ctactttctg tccctatgaa tgtgatggct ctagggacct cctctgagtg 35239  
 gaatcagaca gcattttcct tttttgactg gcttatttca ctgagccaag tgcggtggca 35299  
 cagcctgta atccccaaac tttgggagac cgaggcgggc gcatcaccag aggacaggag 35359  
 nncgagacca gcccggccaa cagggggaaa ccccatcact agggagcctg cagaaagaaa 35419  
 gccaccacat ggctgctgg agccacacaa tcccagcaaa acagggacgc taaacgtagg 35479  
 agaaacacac aaccccagga ggcggaggtc gcagtggcc gagatcgtgc cattacactc 35539  
 cagcctgggc aacaagagtg aaactccgtc tctcctaaaa atacaaaaaa attagctggg 35599  
 catggtggca catgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg 35659  
 aacccgggag gtggaggttg taatgagcca aggttgccg cgaagggatg ggtaggggcc 35719  
 cgagagtgc cagtctgcat cccctggccc tgcgcag gg acc aac gaa tgc ttg 35773

ly thr asn glu cys leu

295

gac aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc 35821  
 asp asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly  
 300 305 310

tac gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga 35869  
 tyr glu cys leu cys pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg  
 315 320 325 330

tgc gaa g gtgatttccg ggtgggactg agccctgggc cccctctgcg cttcctgaca 35926  
 cys glu a

tggcaaccaa acccctcatg cctcagtttc cccatctgtt aagtgtgctt gaaagcagtt 35986  
 aggaggggtt catgagattc cacctgcatg gaaaactatc attggctggc cagagtttct 36046  
 tgcctctggg gattagtaat taagaaattt caggccgggt gcgtaatccc tgtaatccca 36106  
 acaccttggg acgccgaggc gggcagatca cctgaggtcg ggagttccag accagcctga 36166  
 ccaacatgga gaaaccccgct ctctactaaa aatacaaaat tagccgggct tgggtgtgca 36226  
 tgcctataat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcacttgaa cctgggaggt 36286  
 ggaggttggt gtgagccaag atcgtgccat tgcactccag cctgggcaac aagagtgaag 36346  
 ctccatccaa aaaaaaaaga aaagaaaaga aaaaaaagaa aagaaatttc agctgacaca 36406  
 gcttcacact cttggttggg ttcccgtggt gaatgatgag gtcaggtgat gactggggat 36466  
 gacacctggc tgtttccttg attacatctc ccgagaggct gggctgtctc ctggctgcct 36526  
 tcgaaggtgt gggttttggc ctgggcccc tgcctccgtc tctagccatt ggggaagagc 36586  
 ctccccacca agcctcttct tctctcttcc ag at atc gat gag tgt cag gat 36638

sp ile asp glu cys gln asp

335

ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag 36686  
 pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys  
 340 345 350 355

tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc 36734  
 cys gln cys glu glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys

360

365

370

- 18 -

aag gct gtg g gtgagcacgg gaaggcggcg ggtggggggcg gcctcacccc 36784  
lys ala val g  
375  
ttgcaggcag cagtgggtggg ggagtttcat cctctgaact ttgcacagac tcatatcccc 36844  
tgaccgggag gctgtttgct cctgagggct ctggcagggg agtctgccgc cctgttagga 36904  
cttgggcttg ccagggggat gcctgcatat gtcctagttt ttgggaatat ccagttaacg 36964  
gaaccctcag ccctactggt ggaacaggaa ccggctttcc tttcagggac aacctgggga 37024  
gtgacttcaa ggggttaaag aaaaaaatt agctgggcat ggtgccacac acctgtggtc 37084  
ccagctactc agaaggctga ggcgggagga ttgcttgagg gcaggaggat tggttgatcc 37144  
tcccacctca gcctccggag tagctgggac ctgaggtgca tgccactatg cctgggctaata 37204  
tttctttttt cttttttttt ttttttcgag acggagtctc gctctgttgc ccaggctgga 37264  
gtgcagtggc aggatctcgg ctcaactgaa gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc 37324  
tgccctcagcc tcccagtag ctgggactac aggagccgc cactgcacca ggccaatttt 37384  
tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagcc aggatggtct cgatctcctg 37444  
acttcgtgat ccgccacct cggccttcca aagtgtcggg attacaggcg tgagccactg 37504  
cgcccagccg ctaattttca ttttttagt aaaaacaggg tttcaccatg ttggccaggc 37564  
tagtcttgaa ctctgaacc caagtgatcc tctgccttg gcctcccaa gtgctgggat 37624  
tacagacacc acacctggct attattattt ttagagaca ggggtgctgct ctatcttcca 37684  
gcctgtagtg cagtgcagcc tccatcatag ctgctgcag ccttgacctc ctgggttcac 37744  
gtgatcgtcc cgcctaagcc tctggaggag ctgggagtac tggcatgtgc caccatgcct 37804  
ggttaatttt tttttttttt tttttgagac agagtctcat tctgtcacc aggctggagt 37864  
gcggtggtgc gatcttggct tactgaaacc tccacctccc aggttccagc aattctcctg 37924  
cctcacct ctgagtagct gggattacag gtccgggcta ccaaacctgg ctagtttttg 37984  
tatgttttagt agagacaggg tttcaccatg ttgggtgagc tgggtctgat tctcccgct 38044  
cagcctccca aagtgtcggg attacaggct tgagccaccg tgccctggctt tttttttttt 38104  
tttttttttt gtggcaataa ggtctcattg tcttgcccag gctagcctta tgctcctagc 38164  
ctcaagtgat cctcctccct cagcctccca aagtgtcggg attacaggct ggccgactg 38224  
tgccgttcc cgttgggagg tcttttccac cctcttttcc tgggtgcctc ctctggctca 38284  
gccgcacct gcaggatgac acaaggggat ggggaggcac tcttggttcc atcgacgggt 38344  
cccctctgac cccctgacct cgtcccccgg acccccag gc tcc atc gcc tac ctc 38399  
ly ser ile ala tyr leu  
375 380  
ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg agc 38447  
phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg ser  
385 390 395  
gag tac acc agc ctc atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg gac 38495  
glu tyr thr ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu asp  
400 405 410  
acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag aga 38543  
thr glu val ala ser asn arg ile tyr trp ser asp leu ser gln arg  
415 420 425



- 19 -

atg atc tgc ag gtgagcgctg cccctgcctg cagccttggc ccgcaggtga 38594  
 met ile cys se  
 430  
 gatgagggct cctggcgctg atgcccttct ctctcctgc ctgag c acc cag ctt 38649  
 r thr gln leu  
 435  
 gac aga gcc cac ggc gtc tct tcc tat gac acc gtc atc agc aga gac 38697  
 asp arg ala his gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp  
 440 445 450  
 atc cag gcc ccc gac ggg ctg gct gtg gac tgg atc cac agc aac atc 38745  
 ile gln ala pro asp gly leu ala val asp trp ile his ser asn ile  
 455 460 465  
 tac tgg acc gac tct gtc ctg ggc act gtc tct gtt gcg gat acc aag 38793  
 tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val ala asp thr lys  
 470 475 480  
 ggc gtg aag agg aaa acg tta ttc agg gag aac ggc tcc aag cca agg 38841  
 gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg  
 485 490 495  
 gcc atc gtg gtg gat cct gtt cat gg gtgcgtatcc acgacgctga 38887  
 ala ile val val asp pro val his gl  
 500 505  
 gggctgcaga gggaatggag ggagcaggaa ggagcttcag gaactgggta gtgggctggg 38947  
 catggtggct caaagcacct gtaatccag cactttggga ggccaagggtg ggtggatcat 39007  
 caagaccagc ctgaccaaca tggtgaaacc tcgtctctac taaaaataca aaaattagcc 39067  
 ggggtgtgggtg gtgggcacct gtaatccag ctgctcggga ggctgaggca ggagaatcac 39127  
 ttgaacctgg gagatggagg ttgcagttag ccaagacagc cccactgcac tccagcctgg 39187  
 gtgacagagt gagactccgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa ctaaacaaaa aactgggttag 39247  
 tggctagaca acaggatggg atcttccaag cccatggctg actcagcagc tcctgggtca 39307  
 agacactgtg acctgtgtcc cctggcagga agcatcgccc ctgccacctg cccgggtgtac 39367  
 tctgtacctg tcaggtgaca tctgctacct aagcacgtga gaggtggcat ttcacagttt 39427  
 cagtgtgggtg ctgacaaccc gggacgcaca ctgtccttgc agctacaatc aggaggtgaa 39487  
 tgttgggttt ccagcagaga aactggaga aggcacactt ggtgtctgga agggaaaagc 39547  
 aggggaagaga gcatcatcag atgcctgcgg gtgaagggtg gcccgtatg gccagcgctc 39607  
 ctttttattt ttatttattt atttatttga gatggaatct cgctctgtcg cccagactgt 39667  
 agtgcagtgg tgcgatcacg gctcactgca agtccgcct cacaggttca cgccattctc 39727  
 ctgcctcagc ctcccgagta gctgggacta caggcacccg ccaccacgcc cggttaattt 39787  
 tttgcatttt tattagagac ggggtttcac cgcgttagcc aggatgggtc aaatctcctg 39847  
 accctgtgat ccaccgcct cggcctccct aagtgttgg attacaagcg tgagccacca 39907  
 cgccccgcc cttttttatt ttttattttt tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc 39967  
 tagattgcag tggcgtgatc tcggtcact gcagcctccg cctcccaggt tcaagtgatt 40027  
 ctctgcctc aacctcccaa ctaattagga ttacaagcat gtaccacat gcctgactaa 40087  
 tttttgtat ttttagtaga gactgggttt cccatgttg gctaggctgg tctcgaaccc 40147

- 20 -

ttagcctcaa gtaatctgcc tgcctcagcc tcccaaacag cggggattac aggcattgagc 40207  
 cactgtgccc aaccaaccc tggatctctt ttaaacaaga caatgctcgc tgttgccaca 40267  
 gaacaatggg tggggtacat gtggcccagt gtgtttggcc acataactgc caggccagag 40327  
 ggaaagagac tctcagactg tctccactca gatacaaagt tgtgtgttgt gtgcgttgt 40387  
 tctggtctca tttttgtttg ttttgagaca ggggtgctcgt ctgtcactga gtctggagt 40447  
 cagtggcgca atcagagttc actgcagcct caaactcttg ggctcagttg attctccac 40507  
 ttcagcctcc caagtagctg gaactacagg tgaacaccac tgtgcccagc taattttatt 40567  
 tatttttagt agagatgagg tctcactatg ttgcccagge tggctctgac ctctagcct 40627  
 caagcaatcc tctgccttg gtctcccaaa gtgctgggat tacacgtgcg agccattgcg 40687  
 catggcttgt gttcttgtgt ttcttctttt ttctttcgag atggcgtctc agtctgccac 40747  
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcatag ctactgtag cctcaacttc ctgggctcaa 40807  
 gcaatcctct tgatttcagc ctcccgggcc tggccagcat ggtgaaacc cgtctctact 40867  
 aaaaatacaa aaatgtagcc aggcgtgggt gtgggcgcct gtaatcccag ctacaccaga 40927  
 ggctgaggca ggagaatcgc ttgagcctgg aagggtgagg ttgcagcaag ccaagatcgt 40987  
 gccactgcac tccagcctgg gcaacagaga cagactctgt ctcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 41047  
 acccaaacaa gccacatttg gagtttgggg ttcccagcag gactatttcc caagcctgag 41107  
 cctggctgtt tcttccagaa ttcgttgcac gcattggctg ggatcctccc ccgcctcca 41167  
 gcctcacagc tattctctgt cctcccacca g c ttc atg tac tgg act gac tgg 41220  
 y phe met tyr trp thr asp trp  
 510 515  
 gga act ccc gcc aag atc aag aaa ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc 41268  
 gly thr pro ala lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile  
 520 525 530  
 tac tcg ctg gtg act gaa aac att cag tgg ccc aat ggc atc acc cta 41316  
 tyr ser leu val thr glu asn ile gln trp pro asn gly ile thr leu  
 535 540 545  
 g gtatgttcgc aggacagccg tcccagccag ggccgggcac aggcgtggagg 41367  
 a  
 acagacgggg gttgccaggt ggctctggga caagcccaag ctgctccctg aaggtttccc 41427  
 tctttctttt ctttgtttt tctttttttg agatgaggtc ttggtctgtc acccaggctg 41487  
 gagtgcactg gcgcaatcgt agctcactgc agcctccacc tcccaggctc aagtgtatcct 41547  
 cctgcctcac cctcctgagt agctgagatt acagacacgt gccaccacgg cagactaatt 41607  
 ttattttatt tttgggaaga gacaaagtct tggtatgttg gcctggctgg tctcaaactc 41667  
 aggggtgcaag cgatcctccc gcctcagcct tccaaactgc tgggattaca ggcgtgggcc 41727  
 accgtacca gctccttga agtttttctg acctgcaact cccctacctg cccattggag 41787  
 agggcgtcac aggggagggg ttcaggctca catgtggttg gagctgcctc tccagggtgct 41847  
 tttctgctag gtccctggca ggggtcttc ctgcccggag cagcgtggcc aggcctcag 41907  
 gaccctctgg gactggcatc agcacgtgac ctctccttat ccacttgtgt gtctag 41963  
 at ctc ctc agt ggc cgc ctc tac tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc 42010  
 sp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser lys leu his ser  
 550 555 560

- 21 -

atc tca agc atc gat gtc aac ggg ggc aac cgg aag acc atc ttg gag 42058  
 ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu  
 565 570 575  
 gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag 42103  
 asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu  
 580 585 590  
 gtgtggctta cgtacgagat gcaagcactt aggtggcgga tagacacaga ctatagatca 42163  
 ctcaagccaa gatgaacgca gaaaactggt tgtgactagg aggaggtcctt agacctgagt 42223  
 tatttctatt ttcttctttc tttttttttt tttttttgag acagagtttt gctctcggtt 42283  
 cccaggctgg agggcaatgg catgatctcg gctcacgcga acctccacct cccagggttca 42343  
 agtgattctc ctgtctcagg ctccccagta gctgggatta caggcatgca ccaccacat 42403  
 gcccggttaa ttttgtattt ttagtagaga cggagtttct ccatgttggt caggctggtc 42463  
 tcgaactccc gacctcaggt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag 42523  
 acttgagcca ccgcgccag ctatttctgt tttctttctt tcttcttctt cttttttttt 42583  
 ttctaagaga caggatctca ctctgtcccc aggcaggagt gcagtgtgt gatcatagct 42643  
 cactgcagcc ttaacctcct gggctcaagt gatcttccca cctcagcctc ccaagtagct 42703  
 ggaactacag gtgcacacca ccatgccag ctcatTTTTTg tttttttttt ttttttgaga 42763  
 cagtctcggt ctgtcacccc ggctggagt cagtggtaaca atcttggtc actgcaacct 42823  
 ctgcctccca ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagttg agattacagg 42883  
 catgtgtgcc atcatacctg gctgattttt gtattttttt ttagagatgg ggtctcagta 42943  
 tggtgaccag gcttgtctta aactcccggc ctcaagtgat cctccactt cagtctccca 43003  
 aagtgtggg attacaggca tgagccactg cggccggtt gttttctttt ttttttcggt 43063  
 ttttgagac ggaatttcac ctttggtgcc caggatggag tgcaatggca cgatatcgcc 43123  
 tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcaaa ccattttcct gcctcagcct tcttagtagc 43183  
 tgggattaca agcatgtgcc accacgccc gctgattttt tttttttagt agagatgggg 43243  
 tttctccatg ttggccaggc tggctcgaac ctctgacct caggtcattc gccacctct 43303  
 gcctcccaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccgtg cccggtggtt tgtattcttt 43363  
 ttactgagag tctgtaaaagg cagtgtcct ctgtcacatg tgatcttggc tctcagggga 43423  
 catttgga tttctagaga ttttttggt gtcacaagtc aatggggaag actgttggca 43483  
 tttagtgggt agaggtggt gacgtgctg aacaccaga acagggaagt agcaggccct 43543  
 agatagagcc atcgtgggga aacctgctc taaggaaatg gcgctatttt ataaccac 43603  
 gttcctggca tgattacaa cagccaaaag tggagtcccc ccaagtgtgt tcttccattt 43663  
 gcattgcagt aaaggaatag ctgaggccgg gtaatttata aagaaaagag atttaaactg 43723  
 ggtatggcag tttatgcta taatcccaga actttgggag gctgaggcag gaggatcgct 43783  
 tgagtccagg agtgtgagac cgagaccagc ctggccaaca tgacgaaact ctgtctctac 43843  
 aaaaaataca aaaagtaggc caggcacggt ggttcacgcc tgtaatccca gcactttggg 43903  
 aggccgagge gggcggtatca cgaggtcagg agatcgagac catcctggct aacacggtga 43963  
 aaccccgctct ctactaaaaa tacaaaaaca aaattagccg ggtgtggtgg caggcgctg 44023  
 tagtccagc tactcgggag gctgaggcgg gagaatggcg tgaacccggg aggcggagct 44083  
 tgcaagtgag caagatcgcg cactgcact ccagcctggg tgaccgagtt gagactccgt 44143  
 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataca aaaagtagcc aggtgtggtg gcaggcacct 44203  
 gtaatcctgg gttctcgaga ccgaggcatg agaattgcct gacccagga ggtggaggct 44263

- 22 -

gcagtgagcc aagatcatgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtgg gactctgtct 44323  
caaaaaacaa caaaaaaaa gttctggaaa tggatggtgg tgatggtgat acttccacaa 44383  
cagcgtgaat ctgcttaagg ccaccgaact gtgcactcac aaatagtcga gatggtacat 44443  
tttatgttat gtgtatttca ccacaattaa aaactagtgtg tgggccaggt gtggtggttc 44503  
atgcctgtaa tcccagcact ttgggagggtc agaggggaggt ggatcatgag gtcagcagtt 44563  
cgagaccagc caggccaaca tgggtgaaacc ccactctctac taaaaatata aaaattagcc 44623  
aggcgtggtg gcacatgcct gtagtccag ctacttgaga ggctgaagca ggagaatcgc 44683  
ttgaacctgg gaggctaaga ttgcagtgag ccgagatcgt gccactgcac tccagcctgg 44743  
acgacagagt gagacttcgt ctcaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaattagc tgtgggtcag 44803  
gcactgtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga ccgaggtagg tggatggcct 44863  
gaggtcagga gttcgaatcc agcctggcca acatggtgaa agcccgctctc tactaaaaat 44923  
acaaaaaatt agtcaggtat gttggcacac ctgtaatccc agctactcgg gaggtgaag 44983  
caagagaatc gtttgaaccc aggaggtgga cgttgcagtg agccgagatt gggccactgt 45043  
actccagcct gggcaacaaa agtgaaactc tgtctgaaac aaacaaacaa acaaacaaac 45103  
agacaaacaa aaaaactagt tgtggagaga ggggtggcctg tgtctcatcc cagtgtttta 45163  
cgggatttgt catcttcctt gctgcctgtt tag gac aaa gta ttt tgg aca gat 45217  
asp lys val phe trp thr asp  
595 600  
atc atc aac gaa gcc att ttc agt gcc aac cgc ctc aca ggt tcc gat 45265  
ile ile asn glu ala ile phe ser ala asn arg leu thr gly ser asp  
605 610 615  
gtc aac ttg ttg gct gaa aac cta ctg tcc cca gag gat atg gtt ctc 45313  
val asn leu leu ala glu asn leu leu ser pro glu asp met val leu  
620 625 630  
ttc cac aac ctc acc cag cca aga g gtaaggggtg gtcagcccca 45358  
phe his asn leu thr gln pro arg g  
635 640  
ccccccaac cttgaaacct ctttgtggaa actctggaat gttctggaaa tttctggaat 45418  
cttctggtat agctgatgat ctcgttcctg cctgactcc gcttcttctg ccccag 45474  
ga gtg aac tgg tgt gag agg acc acc ctg agc aat ggc ggc tgc cag 45521  
ly val asn trp cys glu arg thr thr leu ser asn gly gly cys gln  
645 650 655  
tat ctg tgc ctc cct gcc ccg cag atc aac ccc cac tcg ccc aag ttt 45569  
tyr leu cys leu pro ala pro gln ile asn pro his ser pro lys phe  
660 665 670  
acc tgc gcc tgc ccg gac ggc atg ctg ctg gcc agg gac atg agg agc 45617  
thr cys ala cys pro asp gly met leu leu ala arg asp met arg ser  
675 680 685  
tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttggtt ctgcgtcctg tgtcctccaa 45667  
cys leu thr g  
690  
ctgccccctc ctgagcctct ctctgctcat ctgtcaaag ggtacctcaa ggtcgttgta 45727

- 23 -

aggactcatg agtcgggata accatacttt tcttggatgg acacatcagc accgggcttg 45787  
 acatttacc agttcccctt tgatgcctgg tttcctcttt cccggccccc tgaagagggtg 45847  
 atctgatttc tgacaggagc cctgaggag gaaatggtcc cctttgttga cttttctttt 45907  
 tctttatttt tttcttttga gatttgctgt caccagcct ggaatgcagt ggtgccatct 45967  
 tggtcactg ctacctctcc cactgggttc aagcaattct cctgcctcag cctcccaagt 46027  
 agctgggatt acaagcatgc gccaccatgc ctggctaagt tttgtatttt tagtacagac 46087  
 agggtttctc catgggtggcc aggttggtct tgaactcctg acctcagggtg atcctccac 46147  
 ctctgcctcc cgaagtgcta cgattacagg catgagccac cgcgcccata cccctttgtt 46207  
 gacttttctc atcctctgag aaagtctcag ttgaggccag cacctccctc aagtgaattg 46267  
 aatctccctt ttgaacaaca acaaataaca atatgacca gacgtgggtg ctacacctg 46327  
 tgggtcccagc tactcgggag gctgagggtg gaggattgct tgagcccagg aggtcaaggc 46387  
 tacagagagc tataatcaca ccacttcaact ccagcctggg ggacaaagt aaaccctgtc 46447  
 tgaaaaaaac aaaaaagaa aaaggaaaaa gaaacaatac gatcacaag tagatattca 46507  
 tagtgtttat tttcagtact cttttttttt tttttttttt tttttgagac ggagtcttgc 46567  
 tctgttgccc aggttggtg gcagtggcac gatcttggct cactgcagcc tctgcctccc 46627  
 aggttcaagc gcttggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcgc ttctcttgc 46687  
 tcagcctccc cagtagctgg gactataggc acgtccact acgcccagct aattttttgt 46747  
 attttttagt agagatggg tttcactatg ttagccagga tggctctgat ctctgacct 46807  
 cgtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gttgggatta tgggcatgag ccactgcacc 46867  
 tggccttttt tttttttttt ttgagatgg agttctgctc ttgttgcca ggctggagt 46927  
 caatggtgtg atctcggtc actgcaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc 46987  
 ctacgcctcc cgagtagctg ggattacagg cacctgccac cagcctggc taatttttgt 47047  
 acttttagta gagacgggtt ttctccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctgacctc 47107  
 aggtgatcca cccacctcg cctcccaaag ttctgggatt acagacatga gccaccgcgc 47167  
 ctggccgtgt ctggcctttt ttagttattt cttttttttt tttttttttt ttgagacag 47227  
 agtcttactc cgtcgcccag gctggagtgc agcgggtgca tgtctgcgca ctgcaagctc 47287  
 cgccccctgg gttcatgcca ttctcctgcc tcagccttct gagtagctgg gactgcaggc 47347  
 gcctgccact acgcccggct acttttttgt atatttagta gagatggagt ttactgtgt 47407  
 tagccaggat ggtctcgatc tctgacttt gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagt 47467  
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcca ggctttttt tttttttttt tttttgagac 47527  
 ggagtcttgc tctgtcgccc aggttggtg gcagtgccat gatctcagct cactgcaagc 47587  
 tccacttccc aggetcacgc cattctccag cctcagcctc ccaagtagct gagactacag 47647  
 gggcccgcca ccacactcgg ctaatttttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca 47707  
 tgttagccag gctggtcttg aactcctaac ctcaggcgat tcacctgcct cggcctccca 47767  
 aagtgtggg attaaaggta tgagccacct cgcctgggtg gagccacctc gccagcctg 47827  
 agccacctca cccagcctaa gccactgtgc ctggcctgat tttggacttt ttaaaaattt 47887  
 tattaataat tatttttggg tttctttttt ttgagacagg gtcttactct gtcacccagg 47947  
 ccatcctgtc tgtctgtcat ccagtgatg ggatcatacc ttgctgcagc ctctacctcc 48007  
 tgggtcaag cgatcctccc cctcagcct cctgagtagc tgggagtaca ggtgtgcacc 48067  
 accacacctg gctaattttt tttttttttt ttgtatatag agatgggtatt ttgccatgtt 48127  
 gaccaggcta gtcttaaact cctggactca ctcaagagat cctcctgcct tggcctccca 48187  
 aggtcatttg agactttcgt cattaggcgc acacctatga gaaggcctg caggcacgtg 48247

- 24 -

gcactcagaa gacgtttatt tattotttca g ag gct gag gct gca gtg gcc acc 48301  
lu ala glu ala ala val ala thr  
695 700

cag gag aca tcc acc gtc agg cta aag gtc agc tcc aca gcc gta agg 48349  
gln glu thr ser thr val arg leu lys val ser ser thr ala val arg  
705 710 715

aca cag cac aca acc acc cga cct gtt ccc gac acc tcc cgg ctg cct 48397  
thr gln his thr thr thr arg pro val pro asp thr ser arg leu pro  
720 725 730

ggg gcc acc cct ggg ctc acc acg gtg gag ata gtg aca atg tct cac 48445  
gly ala thr pro gly leu thr thr val glu ile val thr met ser his  
735 740 745

caa g gtaaagactg ggccctccct aggccctct tcacccagag acgggtccct 48499  
gln a  
750

tcagtggcca cgaacatttt ggtcacgaga tggagtccag gtgtcgtcct cactcccttg 48559  
ctgaccttct ctacttggg ccgtgtgtct ctgggccctc agtttcccta tctgtaaagt 48619  
gggtctaata acagttcttg ccctctttgc aaggattaaa tggggccaaat catatgaggg 48679  
gccaggtcct tcaggctcct ggttcccaaa gtcagccacg caccgtgtgg gtcccaaaat 48739  
tttatcaagg cacattcgtt gcctcagctt caggcatctg cccaaaaagg ccaggactaa 48799  
ggcaaggaga gggagggatt cctcagtact cagcttttca cagaggctcc aaaaggctaa 48859  
ggaatccagt aacgttttaa cacaatttta caattttttt ttttgagacg gagttttgct 48919  
cttgttgccc aggctggagt gcagtggcac gatctcggct cactgcaacc tctggetccc 48979  
gggttcaagc gattctcctg cctcagtctc ccgagtagct gggattacag gcatgcgcca 49039  
ccacgctcgg ctaattttgt atttttagta cagaaggggc ttctctgttg gtcaggctgg 49099  
tcgtgaacte tcaacctcag gtgagccacc cgcctgagcc tcccaaagtg ctgggattac 49159  
aggtgtgagc caccacgcct ggctttttt ttgagacaga gtctcgtct cgcctatgct 49219  
gtactgcagt gacgcagtct gggctcactg taacctccgc ttcccagggt caagtgattc 49279  
ttctgccgca gcctcccatg tagagtagct gggattacag gcacccgcca ccatgcctgg 49339  
ctaattcttg ctttttagt agagatgggg ttccacagtg ttggccaggc tggctcctaaa 49399  
cttctgacct caagtcatct gcctgccttg gccctgccaa agtgctggga ttatagatgt 49459  
gagccaccgc gcctggccta cagtttattc tttggtggct cacacctgta atctcagcac 49519  
tttgggaggc caaggtggga gaatggcttg agcccaggag ttcaagtcca gcctgggcaa 49579  
catagcaaga ccctatctct actacaaaat aaataataaa taaactaatt ttttttcttt 49639  
taaaacccaa ctattcaaca tggcaatgca atatattaaa aaaatttttt ttttctttga 49699  
aacggagtct ctactgtca cccgggctgg agtgcagtgt cgccatcttg gctcactgca 49759  
acctccgcct cccaggtcca agtgattctc ctgcttcagc ctcccagta gctgggatta 49819  
caggcaccca ccaccatacc cagctaatat ttttgattt ttagtagaga tggggtttca 49879  
ctatgttggg caggctgggc tggaactcct gacctcgtga tctgcccag gatcgccggc 49939  
ctcccaaagt gctggggatt gcaggcatga gccaccgtgc ccagccaaaa cttttttatt 49999  
tttatttttt tgggacacgg tctcactgtg taccccagac tggagtgata gagtgtgtc 50059  
atggctcact gcagcctcaa cctccctggg ctcaggtgat ctccctgctt cagtctccca 50119

- 25 -

ggtagctggg actacaggca tgagccacca caccagcta atttttgaat tttttttag 50179  
 agacaggggtt tcaccttggtg gccagactt gtctctaact ccagggctca agcgatctgc 50239  
 ccaccttggc ctcccaaagt gctgagatta atgcaattta aaaaattttt tggccaggcc 50299  
 tgggtggctca tgacctgtatt cacaacacct tgggaggcaa aggtgggcag atcacttgag 50359  
 gtcaggagtt cgagactagc ctggccaaca tggtgaaacc ccctgtctac taaaaaata 50419  
 caaaaattac ctgggcacag tgggtgggtgc ctgtaatccc agctacttgg gatgctgagg 50479  
 gtggagaatt gcttgaacct gggaggcaga agttgcagta agccaagatc atgccactgg 50539  
 actccagcct cagtgcaga gcaaaactct gtctccaaaa aaattgtttt tttttttttt 50599  
 ttttcaaatc atcacactac agccaaggcc tggccactta cttttgtaaa taaagtttta 50659  
 ttggagccag tggaccagtg aggccgaatc ttgcagggtg aagatcacag tctatccttg 50719  
 aaaaattttga tattttgttc attgggtgggt ttttcattaa tttaaatttt aaaaaataac 50779  
 atattaaagg ctggtgtgga ggtgcacgcc tgcagtccta gctactccca gaggctgagg 50839  
 cgggagactt gcttgagccc aagagttgaa gtccagcctg ggcaacatag cgagaccccc 50899  
 atctctaaaa ataaaaataa tgcattagaa tattattgga ttctgggca gggcacagtg 50959  
 gctcacacct gtaatcccag cactttggga ggctgagggtg ggtggatcac ctgaggtcag 51019  
 gagtttgaga ccagcctggc caacatgggtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 51079  
 tagccaggcg tgggtggcagg tgacctgtaat ccagctact cgggaggctg aagcacgaga 51139  
 atcgcttgaa tccaggaggc ggaggttgca gtgagctgag attgcgccat tgcactccag 51199  
 cctggaggac aagagtgaat ctccattccc ctctgcaaag aaaaggaata ttatcagatt 51259  
 cctaagcttt ttggctcccc cttagtttg ggggctggg tggtgagtgt ctgacctggc 51319  
 ctactgtcc tccctggatg tgatgagacc cagggtgtggg tcaggatgtc attcgtttgt 51379  
 ccaccagagg gcgccccaaac tgctttgagc tgctgggaaa tggtgctcct agacttttag 51439  
 caaacaaca aaaaaaatg gcacatcggc aaatttcaga ccattctttt tttttttttt 51499  
 tttggttcca gagtagctga aatctttgtt cagttacaag caggataaaa tggaaactgc 51559  
 ctgggagagg ctgagaaacc ttcttgcttg ggggaggttg ggcaactgta gaattaatcg 51619  
 cttcacagac cagcccatcc aggactcctc aaatttggca aaaaagccat tcattcattc 51579  
 attcatttat gtagagacga gggggatctg gctatattgc ctagatttgt ctcaaattcc 51739  
 tggcctcaag tgatcctcct gccttggctc actaatgtgc tgcgattaca ggcatgagcc 51799  
 accgtgccta gctctagtgg acttgaaatg ttgccttgcc cagggccctt atgttgaatg 51859  
 gccaggtcc acttgatagg ttctgtacca aggttaaccc catcccataa tgcctgggac 51919  
 agttgatgca ggacaatcag cttctgtgcc attcaacctc aggactgagc atgctgggca 51979  
 ttgtgggggc cgaaggtggc tccctgtcc cttcaaaaat accctctttt tcttttcttc 52039  
 tttttttttt tttttttttt ttgagacgaa gtcttgcctc gttgccccag ctagagtga 52099  
 gtggtgcat ctcagctccc cgcaacctct gcttcccggt ttcaggcgat tctcctgcct 52159  
 cagcctcctg agtagctggg attacagggtg ccaccgcca cagctggcta atttttgtat 52219  
 ttttagtaga gacagggttt caccgtgttg gccaggctgg tcttgaactc ctgacctcag 52279  
 gcaacctgcc cacctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggtttgagc cactgggcct 52339  
 ggcctttttt tttttttttt gagaggaggt ctcactctgt tgcccaggct ggagtgaat 52399  
 ggcgcgatct tgactcactg caactccatt tcccgggttc aagtgttct cctccctcag 52459  
 cctcccaagt agctgggatt acagggtgcat gccaccacgg ccagctaatt ttgtattttt 52519  
 agtagagaca gggtttcaact atgttgatca tgctggtctc aaactcctga ccttaggtga 52579  
 tctgcccgc ttagcctccc aaagtgttg gattacaggt gtgagccacc gcgcccagac 52639

- 26 -

caaaatatgc tcattttaat aaaatgcaca agtaggttga caagaatttc acctgcaacc 52699  
 ttgtcaacca cctagaataa aagcctctgc agccctcccc taaagactca tcaatgtgag 52759  
 gctcaagaac cttcttaggc tgggctcggt ggctcatttc tgtaatccct gcactttgga 52819  
 aggctgagggc aggaggatct cttgaggcca ggagttcaag acaagcctgg gcaacatagc 52879  
 cagacctctg tttctatccc ccacaaaaag aaccttctta aaccggaatt gagtcctaca 52939  
 acctcgataa ctcacaaata agcccgtgtg gcctctcaca gacttgggaa gttctccaag 52999  
 tgtccaggga gatgtgccag gcgctttcct gccgtgacca ccgtcctctg cctgctccat 53059  
 ttcttggtgg ccttccttta gacctgggcc tcaactcttgc ttctctcctg cag ct ctg 53117  
 la leu  
 750  
 ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc agt agc gtg agg 53165  
 gly asp val ala gly arg gly asn glu lys lys pro ser ser val arg  
 755 760 765  
 gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc g gtaagcgcgg gccgggtcccc 53210  
 ala leu ser ile val leu pro ile v  
 770 775  
 cagcgtcccc caggtcacag cctcccgtca tgtgacctcg tgcctggctg gttgggcctg 53270  
 ttcacttttt ctcctggaca gggaacagcc ccaactggtgt cctttatcac ccccacggcc 53330  
 tctcctggct tggggctgac agtgacaaga tcagacagct aaggggtcag atggaggatg 53390  
 tggagctggg tcccgtgctg tggaatagcc tcaccgagat ttgagtgcct tctggggaac 53450  
 tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgcctcac ccatgctcat 53510  
 cctaactcgg ttaccatcac atctcttttt tcttttttct ttaaatttta agaaaaaaga 53570  
 aatttaattt ttttgagaga cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca 53630  
 ccatcatgcc tcgctgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctccca cctcagcctc 53690  
 ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttcctatt tcttaaaaag tcacagccct 53750  
 gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctgg ggcgtggctc 53810  
 acccagtggg cttcagggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt ggtggcttat 53870  
 gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgcttgggc tcaggagttc 53930  
 gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaaggtaaa aaattagctg 53990  
 ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg aggatcgctt 54050  
 gaacctggga ggtcgagggt gcagtgaact gagatcatgt cactgcactc cagcctgggtg 54110  
 acagagcaag acccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt atgcatagat 54170  
 ttgcctcttt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc caggctggag 54230  
 tacagtggct caacctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag caattctcct 54290  
 gcctcagcct cctgagtagc tgggactaca gcgccgccca ccatgcccag ctaatttttg 54350  
 tatttttagt agagactgac tgggtttcat catgttggcc aggctggtct cgaactcttg 54410  
 acctcatgat ccgccgcct cagcctccca aaatgctggg attacaggcg tgagccacca 54470  
 ggcccaggcc gcaaggcgat ctctaaacaa acataaaaga ccaggagtca aggttatggt 54530  
 acgatgcccg tgttttcaact ccagccacgg agctgggtct ctggtctcgg gggcagctgt 54590  
 gtgacagagc gtgcctctcc ctacag tg ctc ctc gtc ttc ctt tgc ctg ggg 54642  
 al leu leu val phe leu cys leu gly  
 780



- 27 -

gtc ttc ctt cta tgg aag aac tgg cgg ctt aag aac atc aac agc atc 54690  
 val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser ile  
 785 790 795 800  
 aac ttt gac aac ccc gtc tat cag aag acc aca gag gat gag gtc cac 54738  
 asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his  
 805 810 815  
 att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc tcg gtgagtgacc 54784  
 ile cys his asn gln asp gly tyr ser tyr pro ser  
 820 825  
 ctctctagaa agccagagcc catggcggcc ccctcccagc tggaggcata tgatcctcaa 54844  
 gggaccaggc cgaggcttcc ccagccctcc agatcgagga cagcattagg tgaatgcttc 54904  
 tgtgcgctca ttcagaatgt cagcggacaa tggccttggg ggtgtagagg aatgttggat 54964  
 aagcaaatag agagctccat cagatggtga cagggcaaaag aaagtcaaaa ggagttcaga 55024  
 ggccggggcgc ggtggctcat gcctgtaatc ccaggacttt gggaggccga ggctggcgga 55084  
 tcacctgaag tcaggagttt gagaccagct tggccatcat gacaaaaccc cgtctctatt 55144  
 aaaaatacaa aaaattagcc aggcgtggga gtgggcgcct gtaatcccag ctactcggga 55204  
 ggccgaggta gaaaaatcgc ttgaacctag gaggcagagg ttgcagttag ccgagatcgc 55264  
 gccactgcat tccagcccgc gaggcaagag caaaactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 55324  
 ggagttcaga ggcccggcat ggtggttcc acatgtgatc ccagaacttg gggaggttga 55384  
 ggcaggagaa tcacctgagc tcagagttca agaccagcct gggcagcaca gcaagacccc 55444  
 atctctgcaa aaaataaaaa tttagcccag tgtggtgatg agcgcctagt tccagctact 55504  
 agggaggcta aggcaggagg attgcttag gctaaggtag gagattgaga ctgcagttag 55564  
 ttgtgattgc gtcactgcgc tccagcctgg gtgacagagc aagcccttgt ctcttaaaaa 55624  
 aaaaaaaaaa ttcaaagaag ggtttccaga gggccaggag ggaggaagg agaggaggtg 55684  
 ttttattttt ttgcttttat tttttatttt gagacagagt ctctctctgt caccaggtt 55744  
 ggagtgcagt gctgtgatct tggctcactg caacttctgc ctctgggtt caagcaattc 55804  
 ttatgcctca gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca aactatgcc cgggtaattt 55864  
 ttgtattttt agtagagacg aggtttcgcc atgttgccca gactggtctc gaactcctga 55924  
 cctcaagtga tccaccgcc ttggcctccc cagtgctgg gattgcaggc gtgagccact 55984  
 gcgcccgcct tgatctttac acaaggggtt tagggtaggt agccttctct gaaccaggag 56044  
 aacagcctgt gcgaaggccc tgaggctgga ccgtgcctgt tgggtttgag gccgtttag 56104  
 ctggagcaaa cagagagagg ggtaaaaagg caggaggcta ccaggcaggt tgtgcagagc 56164  
 cttgtgggcc actggggagg actttggctt ttgcctgag agcgggtggga agtgactgaa 56224  
 tccgttactc accgtctccc tctggcggct cctgggggaa catgcttggg gatcaggctg 56284  
 ggggaggctg ccaggcccag gaggtgagaa gtaggtggcc tccagccgtg ttctctgaat 56344  
 gctggactga tagtttccgc tgtttaccat ttgttggcag aga cag atg gtc agt 56399  
 arg gln met val ser  
 830  
 ctg gag gat gac gtg gcg tgaacatctg cctggagtcc cgtccctgcc 56447  
 leu glu asp asp val ala  
 835 839  
 cagaaccctt cctgagacct cgccggcctt gttttattca aagacagaga agaccaaagc 56507

- 28 -

attgcctgcc agagctttgt tttatatatt tattcatctg ggaggcagaa caggcttcgg 56567  
 acagtgccca tgcaatggct tgggttgga ttttggttc ttcctttcct cgtgaaggat 56627  
 aagagaaaca ggcccgggg gaccaggatg acacctccat ttctctccag gaagtttga 56687  
 gtttctctcc accgtgacac aatcctcaaa catggaagat gaaaggggag gggatgtcag 56747  
 gccagagaa gcaagtggct ttcaacacac aacagcagat ggcaccaacg ggacccctg 56807  
 gccctgcctc atccaccaat ctctaagcca aaccctaaa ctcaggagtc aacgtgttta 56867  
 cctcttctat gcaagccttg ctagacagcc aggttagcct ttgccctgtc acccccgaat 56927  
 catgaccac ccagtgtctt tcgagggtgg tttgtacctt ccttaagcca ggaaaggat 56987  
 tcatggcgtc ggaaatgac tggtgaatc cgtggtggca ccgagaccaa actcattcac 57047  
 caaatgatgc cacttcccag aggcagagcc tgagtactg gtcaccctta atatttatta 57107  
 agtgctgag acaccgggtt accttggccg tgaggacacg tggcctgcac ccagggtgtg 57167  
 ctgtcaggac accagcctgg tgcccatcct ccgacccct acccacttcc attcccggtg 57227  
 tctccttgca ctttctcagt tcagagttgt aactgtgta catttgcat ttgtgttatt 57287  
 attttgact gtttctgtc gtgtgtgtg ggatgggatc ccaggccagg gaaagcccgt 57347  
 gtcaatgaat gccggggaca gagaggggca ggttgaccg gacttcaaag ccgtgatcgt 57404  
 gaatatcgag aactgccatt gtcgtcttta tgtccgcca cctagtgtt ccacttctat 57467  
 gcaaatgcct ccaagccatt cacttcccca atcttgtcgt tgatgggtat gtgttataaa 57527  
 catgcacggt gaggccggg gcagtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc 57587  
 gaggcgggtg gatcatgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac gtgaaacccc 57647  
 gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggcgtggtg cgggcacctg tagtcccagc 57707  
 tactcgggag gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aagcggagct tgcaagtgc 57767  
 cgagattgag ccaactgcagt ccgcagctg gcctgggcca cagagcgaga ctccgtctca 57827  
 aaaaaaaaa acaaaaaaaaa accatgcatg gtgcatcagc agcccatggc ctctggccag 57887  
 gcatggcgag gctgagggtg gaggatggtt tgagctcagg catttgaggc tgtcgtgagc 57947  
 tatgattatg ccaactgctt ccagcctgg caacatagta agacccatc tcttaaaaaa 58007  
 tgaatttggc cagacacagg tgcctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggctgagc 58067  
 tggatcactt gagttcagga gttggagacc aggcctgagc aacaaagcga gatcccatct 58127  
 ctacaaaaac caaaaagtta aaaatcagct gggtagcgtg gcacgtgcct gtgatcccag 58187  
 ctacttggga ggctgaggca ggaggatcgc ctgagccag gaggtggagg ttgcagtgc 58247  
 ccatgatcga gccactgcac tccagcctgg gcaacagatg aagaccctat ttcagaaata 58307  
 caactataaa aaaataaata aatcctccag tctggatcgt ttgacgggac ttcaggttct 58367  
 ttctgaaatc gccgtgttac tgttgactg atgtccggag agacagtgc agcctccgtc 58427  
 agactcccgc gtgaagatgt cacaaggat tggcaattgt cccagggac aaaacactgt 58487  
 gtcccccca gtgcaggga ccgtgataag ctttctggt ttcggagcac gtaaatgcgt 58547  
 ccctgtacag atagtgggga tttttgtta tgttgactt ttgtatattg gttgaaactg 58607  
 ttatcactta tatatatata tatacacaca tatatataaa atctatttat ttttgcaaac 58667  
 cctggttgct gtatttgtt agtgactatt ctggggccc tgtgtagggg gttattgcct 58727  
 ctgaaatgcc tcttctttat gtacaaagat tatttgcacg aactggactg tgtgcaacgc 58787  
 tttttgggag aatgatgtcc ccgttgatg tatgagtggc ttctgggaga tgggtgtcac 58847  
 tttttaaac actgtataga aggttttgt agcctgaatg tcttactgt atcaattaaa 58907  
 tttcttaaat gaaccaattt gtctaaactc gatgcacgtt cttctgttcg cgcgttctt 58967  
 tttgttttt tttttttcct gagatggagc ctggctctgt caccctggc tggagtgcag 59027

- 29 -

```

tggcatgata tgggcttact gcaagctccg cctcccagggt tcaagcaatt ctccctgcctc 59087
agcctcccta gtagctagga ttacagggtga gtgccaccac gcctggccaa tttttttttt 59147
tttttttttt ttgagacaga gtctcgctct gtcaccagg ctggagtga gtggtgtgat 59207
ctcggtcac tgcaagctct gcctcccagg ttaatgccat tctcctgtct cagcctcctg 59267
agtagctggg gccacaggcg cctgccacca cgcccggcta attttttttt gtacttcttt 59327
tagtacagac ggggtttcac catgttagcc aggatgtct cgatctcctg accttgtgat 59387
ccacctgctt cggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgggtggcca 59447
acgctaattt ttttgttttt ttagatggag tcttgtctct tggcccaggc tggagtgcag 59507
tggcgtgata tctgcctact gcaagctccg cctcccgggt tcatgccatt ctccctgcctc 59567
agcctcctga gtaactggga ctacaggcac ccgccaccac gcccggttaa ttttttgtat 59627
tttttagtaga gacagggttt caccgtgtta gccaggatgg tcttgcctc ctgaccttgt 59687
gatccacccg tctcggcctc ccaaagtgt gggattagag gtgtgagcca ccacacctgg 59747
cctagcctgg ctaatttttg tatttttggg agagacgggg tttcacctat ttggtcaggc 59807
tggtcttgaa cttctgacct caggtaatct gcctgcctca gtctcccaa gtgctgggat 59867
tacagggtgt agccaccgag cctggcctca ctccctctct tcatctgttt gtggattgga 59927
ctcccaggga gaaggaccca gaaggggaag actcccagaa ctccgggcaa gatgcaatct 59987
ccgtgggctg cca 60000

```

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 2

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex1F

&lt;400&gt;

cacattgaaa tgctgtaa gacg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex1R

- 30 -

&lt;400&gt;

ctattctggc gcctggagca agcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 4

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex2F

&lt;400&gt;

ttgagagacc ctttctcctt ttcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex2R

&lt;400&gt;

gcatatcatg cccaaagggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex3F

&lt;400&gt;

ttcctttgag tgacagttca atcc

- 31 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 7

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex3R

&lt;400&gt;

gataggctca atagcaaagg cagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Mut191-2F

&lt;400&gt;

acagttcaat cctgtctctt ctct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex4AF

&lt;400&gt;

gtggtctcgg ccatccatcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 10

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

- 32 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex4ARF

&lt;400&gt;

agccatcttc gcagtcgggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 11

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Mut 509insCR

&lt;400&gt;

cgagccatct tcgcagtcgg ag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex4BF

&lt;400&gt;

ccccagctg tgggcctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 33 -

&lt;223&gt; Ex4BR

&lt;400&gt;

cgccccccacc ctgccccgcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex6F

&lt;400&gt;

tctctcttcc tctctctggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex6R

&lt;400&gt;

tctgcaagcc gcctgcaccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 16

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; MutC255GF

&lt;400&gt;

ctctggctctc acagtgcacac gc

- 34 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Mut E291XR

&lt;400&gt;

gcaccgagac tcaccgcaat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex7F

&lt;400&gt;

ggcgaagggg tgggtagggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex7R

&lt;400&gt;

gttgccatgt caggaagcgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido



- 35 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex9F

&lt;400&gt;

cccctgacct cgctccccgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex9R

&lt;400&gt;

gctgcaggca ggggcgacgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex10F

&lt;400&gt;

atgcccttct ctctctctgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 23

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 36 -

&lt;223&gt; Ex10R

&lt;400&gt;

agccctcagc gtcgtggata

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Mut1432delGF

&lt;400&gt;

gggacatcca ggcccccgcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex11F

&lt;400&gt;

tctctcccccg cctccagcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 26

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex11R

&lt;400&gt;

gctgggacgg ctgtcctgcg

- 37 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex13F

&lt;400&gt;

gtcatcttcc ttgctgcctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 28

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex13R

&lt;400&gt;

ttccacaagg aggtttcaag gttggggggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 29

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; MutH635NR

&lt;400&gt;

acctcttggc tgggtcaggt tct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

- 38 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex14F

&lt;400&gt;

aaattttctgg aatctttctgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex14R

&lt;400&gt;

gcagagagag gctcaggagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 32

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex15F

&lt;400&gt;

gaagggcctg cagcacgtgg ca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 33

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 39 -

&lt;223&gt; Ex15R

&lt;400&gt;

tagggagggc ccagtcctt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 34

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex17F

&lt;400&gt;

gggtctctgg tctcggggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 35

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;223&gt; Ex17R

&lt;400&gt;

ggctctggct ttctagagag gg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 36

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgggtcggga cactgcctgg cag

- 40 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 37

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgggtcggga ccctgcctgg cag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 38

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgccaggca gtgtcccgac ccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 39

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgccaggca ggggtcccgac ccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 40

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 41 -

&lt;400&gt;

atgcatttcc cgtcttggca ctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 41

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gatgcatttc cctcttggca ctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 42

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gatgcatttc ccgtcttggc actgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 43

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agatgcattt ccctcttggc actgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 44

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 42 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgtctcttct gtagtgtctg tcacc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 45

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtctcttctg tctgtgtctg tcacc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 46

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgtctcttc tgtagtgtct gtcacct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 47

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgtctcttct gtctgtgtct gtcacct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 48

&lt;211&gt; 23



- 43 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggccgtgtca accgctgeat tcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 49

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gccgtgtcaa ccgctgcatt c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 50

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

aggaatgcag cgtttgacac ggccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 51

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaggaatgca gcgtttgaca cggcccc

- 44 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 52

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctgtgggg gccgtgtcaa ccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 53

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctgtgggg gcgtgtcaac cgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 54

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cggttgacac ggccccaca gct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 55

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 45 -

&lt;400&gt;

gcggttgaca cgccccaca gct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 56

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caaggctgtc gtaagtgtg c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 57

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcaaggctgt cgtaagtgtg gcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 58

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caaggctgtc gttaagtgtg gcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 59

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 46 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

aaggctgtcg ttaagtgtgg c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 60

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gacaacgacc ccgactgcga agatg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 61

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gacaacgacc cccgactgcg aagat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 62

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

acaacgaccc cgactgcgaa gat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 63

&lt;211&gt; 23

- 47 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc ccgactgcga aga

<210> SEQ ID NO.: 64

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc atccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 65

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc acccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 66

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgccact catccgagcc atctt

- 48 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 67

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgcggccact cacccgagcc atctt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 68

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccagctggcg ctgtgatggt ggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 69

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccagctggcg ccgtgatggt ggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 70

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 49 -

&lt;400&gt;

tccagctggc gctgtgatgg tggcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 71

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tccagctggc gccgtgatgg tggcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 72

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgcaaggac aaatctgacg aggaa

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 73

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgcaaggac aactgcggta tgggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 74

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 50 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actgcaagga caaatctgac gaggaaa

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 75

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actgcaagga caactgcggt atgggcg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 76

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caaatctgac gaggaaaact gcggt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 77

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caaatctgac gacaaatctg acgag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 78

&lt;211&gt; 27



- 51 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

acaaatctga cgaggaaaac tgcggtgta

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 79

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

acaaatctga cgacaaatct gacgagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 80

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gggtccctcg cagagtgtca ctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 81

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gggtccctcg ccgagtgtca ctg

- 52 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 82

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgggtccctc gcagagtgtc actgt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 83

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgggtccctc gccgagtgtc actgt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 84

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

aacccatcaa agagtgcggt gag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 85

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 53 -

&lt;400&gt;

aacccatcaa atagtgcggt gag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 86

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaacccatca aagagtgcgg tgagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 87

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaacccatca aatagtgcgg tgagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 88

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tcactctcgg gccctacca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 89

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 54 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tcactctcgg acccctaccc a

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 90

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cactctcggg cccctaccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 91

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cactctcgga cccctaccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 92

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

acgagtgcc gtgcgccgac ggctt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 93

&lt;211&gt; 25

- 55 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

acgagtgcct gtacgccgac ggctt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 94

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgagtgcctg tgcgccgacg gct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 95

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgagtgcctg tacgccgacg gct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 96

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcgaagatgc gaaggtgatt ccgg

- 56 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 97

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggcccagcga agatttccgg gtggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 98

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agcgaagatg cgaaggtgat ttccggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 99

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgcccagcg aagatttccg ggtggga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 100

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 57 -

&lt;400&gt;

tgaagaagag gtaggcgatg g

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 101

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cggttggtga agacgatgga g

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 102

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtgaagaaga ggtaggcgat gga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 103

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggttggtg aagacgatgg agc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 104

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 58 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctccatcgcc tacctcttct tcacc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 105

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctccatcgcc taactcttct tcacc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 106

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gctccatcgc ctacctcttc ttcacca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 107

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gctccatcgc ctaactcttc ttcacca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 108

&lt;211&gt; 25



- 59 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgccggttg tgaagaagag gtagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 109

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtgccggttg gtgagaagag gtagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 110

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtgccggttg gtgaagaaga ggtaggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 111

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgtgccggtt ggtgagaaga ggtaggc

- 60 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 112

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caatagaatc tactggtctg acctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 113

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

caatagaatc tagtgggtctg acctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 114

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcaatagaat ctactgggtct gacctgt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 115

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 61 -

&lt;400&gt;

gcäatagaat ctagtggtct gacctgt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 116

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggcccccgac gggctggctg tggac

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 117

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggcccccgac ggctggctgt ggact

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 118

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtccacagcc agcccgtcgg gggcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 119

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 62 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agtccacagc cagccgtcgg gggcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 120

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcgggagttc cccagtcagt ccagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 121

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcgggagttc cctagtcagt ccagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 122

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgggagttcc ccagtcagtc cag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 123

&lt;211&gt; 23

- 63 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgggagttcc ctagtcagtc cag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 124

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgtccccag aggatattgt tctct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 125

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgtccccag agaattattgt tctct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 126

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgtccccaga ggattattgtt ctc

- 64 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 127

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgtccccaga gaatatgggtt ctc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 128

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tggttctctt ccacaacctc acc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 129

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tggttctctt caacaacctc acc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 130

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 65 -

&lt;400&gt;

atggttctct tccacaacct caccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 131

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt; .

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

atggttctct tcaacaacct caccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 132

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gctgaccttt agcctgacgg tggat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 133

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctgacctt tagctgacgg tggat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 134

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 66 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctgacctt tagcctgacg gtggatg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 135

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gagctgacct ttagctgacg gtggatg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 136

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgctcctcgt cttcctttgc ctg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 137

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgctcctcgg ggtctttgcc tgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 138

&lt;211&gt; 25



- 67 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtgctcctcg tcttcctttg cctgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 139

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtgctcctcg gggctctttgc ctggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 140

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gactcacagc acgtctcctg ggact

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 141

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gactcacagc acatctcctg ggact

- 68 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 142

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actcacagca cgtctcctgg gac

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 143

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actcacagca catctcctgg gac

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 144

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccatcgtggc agcgaaactc gtc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 145

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 69 -

&lt;400&gt;

atgcacttcc cacgtcctgg gag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 146

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

catcgtggca gcgaaactcg t

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 147

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgcacttccc acgtcctggg a

210&gt; SEQ ID NO.: 148

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex8F

&lt;400&gt;

cattgggggaa gagcctcccc

210&gt; SEQ ID NO.: 149

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

- 70 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex8R

&lt;400&gt;

gcctgcaagg ggtgaggccg

210&gt; SEQ ID NO.: 150

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex12F

&lt;400&gt;

actggcatca gcacgtgacc

210&gt; SEQ ID NO.: 151

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex12R

&lt;400&gt;

cgtgtgtcta tccggccacc

210&gt; SEQ ID NO.: 152

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex16F

&lt;400&gt;

gcgctttcct gccgtgacca

- 71 -

210&gt; SEQ ID NO.: 153

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Ex16R

&lt;400&gt;

cctgtccagg agaaaaagtg aac

210&gt; SEQ ID NO.: 154

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador MutI771TF

&lt;400&gt;

cagtagcgtg agggctctgt caa

210&gt; SEQ ID NO.: 155

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador Mut2389+4A&gt;GR

&lt;400&gt;

ctgggggacc ggccggcgc

210&gt; SEQ ID NO.: 156

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 72 -

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg ggtgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 157

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg gttgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 158

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg gtgctgaggc a

210> SEQ ID NO.: 159

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg ttgctgaggc a

- 73 -

210&gt; SEQ ID NO.: 160

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggtcacctcg agagtgtcac tgt

210&gt; SEQ ID NO.: 161

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggtcacctcg actgtgagag cca

210&gt; SEQ ID NO.: 162

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtccctcgca gagtgtcact g

210&gt; SEQ ID NO.: 163

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

- 74 -

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gtccctcgca ctgtgagagc c

210&gt; SEQ ID NO.: 164

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccgtcggggg cctggatgtc t

210&gt; SEQ ID NO.: 165

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccgtcgggg tctggatgtc t

210&gt; SEQ ID NO.: 166

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccgtcgggg gcctggatgt ctc

210&gt; SEQ ID NO.: 167



- 75 -

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcccgctcggg gtctggatgt ctc

210&gt; SEQ ID NO.: 168

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggttggtg aagaagaggt aggcg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 169

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgggttggtga agaaagaggt aggcg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 170

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 76 -

&lt;400&gt;

gccggttggt gaagaagagg taggcga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 171

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggttggtg aagaaagagg taggcga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 172

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actggaagct ggcgggacca cag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 173

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcactggaag ctgggaccac agg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 174

&lt;211&gt; 23

- 77 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgtggtccc gccagcttcc agt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 175

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cctgtggtcc cagcttccag tgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 176

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcgggagttc cccagtcagt c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 177

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

- 78 -

gcgggagttc accagtcagt c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 178

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggcgggagtt cccagtcag tcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 179

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggcgggagtt caccagtcag tcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 180

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccatcggt aagcgcgggc cgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 181

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

- 79 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccatcggt aggcgcgggc cgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 182

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggcccgcg cttaccgatg ggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 183

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggcccgcg cctaccgatg ggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 184

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaaaagaggc tggcccaccc ctt

- 80 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 185

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaaaagaggc ttctccttgg ccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 186

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

aaaagaggct ggcccacccc t

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 187

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

aaaagaggct tctccttggc c

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 188

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 81 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgccttcccg tgctcaccca cagcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 189

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cgccttcccg tgttcaccca cagcc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 190

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggctgtgggt gagcacggga aggcg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 191

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggctgtgggt gaccacggga aggcg

- 82 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 192

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actatctcca ccgtggtgag cccag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 193

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

actatctcca ccatggtgag cccag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 194

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgggctcac cacggtggag atagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 195

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;



- 83 -

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgggctcac catggtggag atagt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 196

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gggctctgtc cattgtcctc cccat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 197

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gggctctgtc cactgtcctc cccat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 198

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

atggggagga caatggacag agccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 199

- 84 -

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

atggggagga cagtggacag agccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 200

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgcaacatgg ctagagactg ccggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 201

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgcaacatgg ctggagactg ccggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 202

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 85 -

&lt;400&gt;

gcaacatggc tagagactgc cgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 203

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcaacatggc tggagactgc cgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 204

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgctgatgac ggtgtcatag gaa

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 205

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgctgatgac gatgtcatag gaa

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 206

&lt;211&gt; 21

- 86 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gctgatgacg gtgtcatagg a

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 207

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gctgatgacg atgtcatagg a

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 208

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tccaaacttc actccatctc aag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 209

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

- 87 -

tccaaacttc agtccatctc aag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 210

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cttgagatgg agtgaagttt gga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 211

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cttgagatgg actgaagttt gga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 212

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gccaaagtgga ctgcgacaac ggctc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 213

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

- 88 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gcccaagtga ctacgacaac ggctc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 214

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gagccgttgt cgcagtcacac ttggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 215

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gagccgttgt cgtagtcacac ttggc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 216

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgctggcca gggacatgag gagct

- 89 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 217

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctgctggcca ggtacatgag gagct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 218

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctcctcat gtccctggcc agcag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 219

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agctcctcat gtacctggcc agcag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 220

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

- 90 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcgccgcgg cggggactgc aggta

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 221

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcgccgcgg cgaggactgc aggta

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 222

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tacctgcagt ccccgccgcg gcgag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 223

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tacctgcagt cctcgccgcg gcgag



- 91 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 224

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaccatcttg gaggatgaaa agagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 225

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gaccatcttg gacgatgaaa agagg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 226

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cctcttttca tcctccaaga tggtc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 227

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

- 92 -

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cctctttttca tcgtccaaga tggtc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 228

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gttttcctcg tcagatttgt ccttgca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 229

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gttttcctcg tcacatttgt ccttgca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 230

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ttttcctcgt cagatttgtc cttgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 231

- 93 -

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ttttcctcgt cacatttgtc cttgc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 232

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ttgtccttgc agtcggggcc acta

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 233

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ttgtccttgc agacggggcc accat

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 234

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

- 94 -

&lt;400&gt;

tgtccttgca gtcggggcca cca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 235

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tgtccttgca gacggggcca cca

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 236

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agcccagtag cgtgagggct ctgtc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 237

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

agcccagtag cgagagggct ctgtc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 238

&lt;211&gt; 25

- 95 -

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gacagagccc tcacgctact gggct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 239

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

gacagagccc tctcgctact gggct

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 240

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tcgccttgct cctcgccgcg gcggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 241

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

- 96 -

tcgccttgct ccccgccgcg gcggg

<210> SEQ ID NO.: 242

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcg cgaggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 243

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcg cgaggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 244

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acggctacag ctaccctcg gtgag

<210> SEQ ID NO.: 245

<211> 25

<212> polinucleótido

- 97 -

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cggctacagc taccacctcg gtgag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 246

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcaccgagg ggtagctgta gccgt

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 247

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcaccgagg ggtagctgt agccg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 248

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccaggagac gtgctgtgag tcccc

- 98 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 249

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cccaggagac gtactgtgag tcccc

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 250

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggggactcac agcacgtctc ctggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 251

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ggggactcac agtacgtctc ctggg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 252

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial



- 99 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcccatcg gtaagcgcg gccgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 253

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ctcccatcg gtcagcgcg gccgg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 254

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggcccgcg cttaccgatg gggag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 255

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccggcccgcg ctgaccgatg gggag

- 100 -

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 256

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

ccagtacatg aagctggtgg gaga

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 257

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

tcttgatctt ggcctgggga cagag

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 258

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cebador

&lt;400&gt;

cagtacatga agctggtggg agg

&lt;210&gt; SEQ ID NO.: 259

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; polinucleótido

&lt;213&gt; secuencia artificial

&lt;220&gt;

- 101 -

<221> cebador

<400>

cttgatcttg gcctggggac aga

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/070001

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**Int. cl7** C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**Int. cl7** C12N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, CIBEPAT, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FOUCHIER SIGRID W. et al. "The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands" Human Genetics. <b>December 2001</b> . Vol 109, n° 6, <b>pages 602-615</b>	1-16
X	PISCIOTTA LIVIA et al. "A "de novo" mutation of the LDL receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia". Biochimia et Biophysica Acta. 21 May 2002. Vol 1587, n° 1, <b>pages 7-11</b>	1-16
X	LIND S. et al. "Genetic charecterization of Swe-dish patients with familial hypercholesterolemia A heterogenous pattern of mutations in the LDL receptor gene". Atherosclerosis <b>August 2002</b> . Vol 163, n°2, <b>pages 399-407</b>	1-16
X	WO 0206467 A1 (BML, Inc.) 24.01.2002	1-16
A	VARRET M. et al. "Results of the molecular analy-sis of the 220 point mutations in the human LDL receptor gene database". Atherosclerosis. <b>October 1997</b> . Vol 134, n° 1-2, <b>pages 74-74</b>	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**12 May 2004 (12.05.04)**

Date of mailing of the international search report

**11 June 2004 (11.06.04)**

Name and mailing address of the ISA/

**S.P.T.O.**

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ ES 2004/070001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4966837 A (UNIVERSITY OR TEXAS SYSTEM) 30.10.1990.	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/070001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0206467 A	24.01.2002	AU 7106001 A CA 2416533 A EP 1304374 A EP 20010950004	30.01.2002 15.01.2003 23.04.2003 17.07.2001
US 4966837 A	30.10.1990	WO 8604090 A AU 5306586 A SE 8603591 A FI 863474 A NO 863438 A DK 409286 A NL 8520436 T EP 0205574 A EP 19860900490 GB 2178743 AB BR 8507148 A HU 41338 A JP 62501327 T DE 3590702 T US 4745060 A CH 671776 A	17.07.1986 29.07.1986 26.08.1986 27.08.1986 27.08.1986 28.08.1986 03.11.1986 30.12.1986 16.12.1985 18.02.1987 31.03.1987 28.05.1987 04.06.1987 16.07.1987 17.05.1988 29.09.1989 29.09.1989 29.09.1989

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070001

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C12N, C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, CIBEPAT, BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FOUCHIER SIGRID W. et al. "The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands". Human Genetics. Diciembre 2001. Vol 109, n° 6, páginas 602-615.	1-16
X	PISCIOTTA LIVIA et al. "A "de novo" mutation of the LDL receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia". Biochimia et Biophysica Acta. 21 Mayo 2002. Vol 1587, n° 1, páginas 7-11.	1-16
X	LIND S. et al. "Genetic charecterization of Swedish patients with familial hypercholesterolemia A heterogenous pattern of mutations in the LDL receptor gene". Atherosclerosis. Agosto 2002. Vol 163, n°2, páginas 399-407.	1-16
X	WO 0206467 A1 (BML, Inc.) 24.01.2002	1-16
A	VARRET M. et al. "Results of the molecular analysis of the 220 point mutations in the human LDL receptor gene database". Atherosclerosis. Octubre 1997. Vol 134, n° 1-2, páginas 74-74.	1-16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

12 Mayo 2004 (12.05.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

11 JUN 2004 11.06.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

J. Manso Tomico

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 349

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/070001

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 4966837 A (UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 30.10.1990.	1-16



**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070001

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0206467 A	24.01.2002	AU 7106001 A	30.01.2002
		CA 2416533 A	15.01.2003
		EP 1304374 A	23.04.2003
		EP 20010950004	17.07.2001
US 4966837 A	30.10.1990	WO 8604090 A	17.07.1986
		AU 5306586 A	29.07.1986
		SE 8603591 A	26.08.1986
		FI 863474 A	27.08.1986
		NO 863438 A	27.08.1986
		DK 409286 A	28.08.1986
		NL 8520436 T	03.11.1986
		EP 0205574 A	30.12.1986
		EP 19860900490	16.12.1985
		GB 2178743 AB	18.02.1987
		BR 8507148 A	31.03.1987
		HU 41838 A	28.05.1987
		JP 62501327 T	04.06.1987
		DE 3590702 T	16.07.1987
		US 4745060 A	17.05.1988
		CH 671776 A	29.09.1989
			29.09.1989
			29.09.1989